

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Biologisch-Pharmazeutische Fakultät



seit 1558

„Identifizierung und Charakterisierung von CAR 4/6 als neue Spleißvariante des Coxsackie Adenovirus Rezeptors – ein putatives Onkogen?“

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
geb. am

Diplom-Biochemikerin Marit Dietel
23.02.1982 in Schleiz

- | | |
|--------------|--|
| 1. Gutachter | Prof. Dr. rer. nat. H. J. Agricola, Jena |
| 2. Gutachter | Prof. Dr. rer. nat. M. Dürst, Jena |
| 3. Gutachter | Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. B. M. Pützer, Rostock |

Tag der Disputation: 27.09.2011

„Man entdeckt keine neuen Erdteile,
ohne den Mut zu haben,
alte Küsten aus den Augen zu verlieren.“

André Gide

Zusammenfassung

Als Mitglied der CAM-Familie (cell adhesion molecules) ist der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) ein wesentlicher Bestandteil von Zell-Zell-Kontakten. Neben seiner Aufgabe als Vermittler von Adhäsion beteiligt er sich auch an der Kommunikation zwischen benachbarten Zellen. Mittels Interaktionen zu anderen, häufig ebenfalls adhäsionsrelevanten Faktoren beeinflusst CAR sowohl die embryonale Entwicklung als auch die Regeneration von Geweben. Auf prä-mRNA-Ebene unterliegt CAR alternativem Spleißen. Aktuell sind fünf Isoformen bekannt, die in Lokalisation und Funktion variieren. Im Kontext der Karzinogenese geht CAR-Verlust mit erhöhter Invasivität und Metastasierung einher. Widersprüchliche Arbeiten zur CAR-Expression in der Tumorgenese bilden die Grundlage für Spekulationen, dass CAR nicht nur als Tumorsuppressor, sondern auch als putatives Onkogen agieren kann.

Um Änderungen in der Expression von CAR mit Entstehung und Progression von Tumoren zu korrelieren, erfolgte zunächst die Etablierung einer hoch spezifischen RealTime-PCR zur Quantifizierung aller Spleißvarianten. Nach Parallelamplifikation und Auftrennung aller vier, Exon 1 und 7 umfassenden Isoformen, fand sich ein unerwartetes fünftes Produkt. Sequenzanalysen der in TOPO-pCR4-klonierten Fragmente offenbarten die Präsenz einer neuen, scheinbar membranständigen CAR-Isoform aus den Exons 1 - 4, 6 und 7 (CAR4/6). Nach Umklonierung von CAR4/6 und dem Volllängentranskript (CAR6/7) in den eukaryotischen Expressionsvektor pBK-CMV bestätigte deren ektopische Expression in HT1080-Zellen die membranständige Lokalisation beider Isoformen. Western Blots validierten die korrekten Molekulargewichte. Daran anschließende, auf cDNA-basierende Analysen zur CAR-Expression in Normalgeweben generierten nahezu ubiquitäre Signale für CAR6/7, wohingegen die meisten Gewebe - einschließlich die des weiblichen Genitaltrakts - negativ für CAR4/6 erschienen. Diese differenzielle Expression der Isoformen wurde in mikroseziertem Gewebe von zervikalem Normalepithel, hochgradigen zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN2/3) und Plattenepithelkarzinomen der Zervix validiert. Während CAR6/7 in allen Proben nachweisbar war, exprimierte normales Zervixgewebe kein CAR4/6. In 42 % aller CIN2/3 und in den meisten Tumoren war die neue Isoform jedoch präsent. Eine positive Korrelation zwischen CAR4/6 und dem Nachweis nodaler Metastasen impliziert eine prognostische Relevanz dieser Variante von CAR. Die ektopische Expression von CAR4/6 in verschiedenen Zelllinien verstärkte deren proliferatives und invasives Potenzial und vermittelte zelllinienabhängig migratorische und adhäsive Effekte. Einflüsse seitens CAR auf ankerungsunabhängiges Wachstum wurden nicht festgestellt.

Zusammengenommen lassen diese Daten durchaus eine mögliche Rolle von CAR4/6 in der Progression von Tumoren vermuten. Umfangreiche Folgearbeiten *in vitro* und *in vivo* sollten die Funktion von CAR4/6 sowohl in Normalgeweben als auch im Tumorgeschehen weiter aufklären.

Summary

As typical member of the CAM family (cell adhesion molecules) the coxsackie adenovirus receptor (CAR) is located at sites of cell-cell contacts and is involved in adhesion and signal transduction. Through homo- and heterodimerisation with other adhesion-relevant factors CAR influences both embryonic developmental and tissue regeneration. Its pre-mRNA underlies alternative splicing and encodes at least five different isoforms mediating partially distinct effects. Loss of CAR expression can affect cell adhesion which in the context of carcinogenesis may influence both invasion and metastatic spread. Functional inactivation of CAR may also result from the interaction with its soluble isoforms. Inconsistent data concerning CAR expression in tumours of varying entity feed speculations that beside its function as tumour suppressor CAR may also comprise a putative oncogene.

To relate alterations of CAR expression to tumour progression, a highly specific real-time PCR protocol for quantification of all splice variants needed to be established. After parallel amplification and agarose gel separation of all four CAR isoforms containing exon 1 and 7, an unexpected fifth product occurred. Following TOPO-pCR4 cloning, sequence analyses revealed that this cDNA corresponds to a further CAR isoform lacking exon 5 but retaining the transmembrane domain encoded by exon 6. Due to its exonic junctions it was termed CAR4/6. After recloning of CAR4/6 and full-length CAR (CAR6/7) in the eukaryotic expression vector pBK-CMV membranous localization of both isoforms was confirmed by ectopic expression in HT1080 cells. Western Blots evidenced the correct molecular weights. Expression analyses using cDNA arrays revealed that most normal tissues, including those of the female genital tract, express full-length CAR but not CAR4/6. Differential expression of both CAR splice variants was validated in microdissected epithelia derived from normal cervical ectodermal tissue, high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2/3) and invasive squamous cervical carcinoma. Whereas full-length CAR was detected in all of the microdissected samples, CAR4/6 was not expressed in normal cervical tissue but in 42 % of CIN2/3 and in most cervical carcinomas. A positive correlation between CAR4/6 and detection of nodal metastases suggests a prognostic relevance for this alternatively spliced CAR gene product. The ectopic expression of CAR4/6 in different cell lines enhanced the proliferative and invasive properties and mediated cell line-dependent migratory and adhesive effects. Anchorage-independent growth, however, was not influenced.

Altogether, these data suggest a possible role of CAR4/6 in cancer progression. Thus, this newly identified CAR isoform requires further investigation both *in vitro* and *in vivo* clarifying CAR4/6 functions in normal tissue and during tumour development.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Summary	ii
1. Einleitung	1
1.1. Zelluläre Adhäsion	1
1.1.1. Adhäsionskontakte mit Verbindungen zum Zytoskelett	1
1.1.2. Tight Junctions	2
1.1.3. Zelladhäsionsproteine	3
1.2. Der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor	6
1.2.1. Genomische Organisation	6
1.2.2. Transkriptionale Regulation	8
1.2.3. Proteinstruktur und zelluläre Lokalisation	8
1.2.4. Gewebeverteilung und Regulation	10
1.2.5. Funktion und Interaktionspartner	11
1.2.5.1. CAR als Zelladhäsionsprotein	11
1.2.5.2. CAR als viraler Rezeptor	12
1.2.6. CAR in der Tumorbologie	14
1.3. Humane Papillomviren (HPV)-induziertes Zervixkarzinom	15
1.3.1. Das Zervixkarzinom	15
1.3.2. Humane Papillomviren	17
1.3.3. HPV im Prozess zellulärer Adhäsion	20
1.4. Grundlegende Aspekte des alternativen Spleißens	21
1.5. Zielstellung	23
2. Material	24
2.1. Geräte	24
2.2. Verbrauchsmaterialien	25
2.3. Chemikalien, Lösungen, Medien	25
2.4. Antikörper	27
2.5. Enzyme und Kits	27
2.6. Größenmarker	28
2.7. Vektoren	28
2.8. Zelllinien	28
2.9. Gewebe	28

3. Methoden	29
3.1. Arbeiten mit prokaryotischen Zellen	29
3.1.1. Herstellung kompetenter Zellen	29
3.1.2. Kultivierung	29
3.1.2.1. Kultivierung auf Agarose-Nährböden	29
3.1.2.2. Flüssigkulturen	30
3.1.2.3. Glycerinkulturen	30
3.1.3. Transformation	30
3.1.4. Koloniehybridisierung	30
3.1.4.1. Vorhybridisierung	31
3.1.4.2. Sondenherstellung	32
3.1.4.3. Hybridisierung	32
3.2. Arbeiten mit adhärent wachsenden eukaryotischen Zelllinien	33
3.2.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen	33
3.2.1.1. Auftauen	33
3.2.1.2. Splitten	33
3.2.1.3. Einfrieren	33
3.2.2. Transfektion mit Lipofectamin 2000	34
3.2.3. Selektion	34
3.2.4. DAPI-Färbung	34
3.2.5. Herstellung von Zytospins	34
3.2.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
3.2.6.1. Gelherstellung	35
3.2.6.2. Probenvorbereitung	35
3.2.6.3. Gellauf	36
3.2.7. Western Blot	36
3.2.7.1. Blot	36
3.2.7.2. Immunreaktion	37
3.2.8. MTT-basierter Proliferationsassay	38
3.2.9. Migrations- und Invasionsassay	38
3.2.10. Adhäsion	39
3.2.11. Ankerungsunabhängiges Wachstum in Weichagar	40
3.3. Arbeiten mit humanem Biopsiematerial	40
3.3.1. Aufarbeitung von Gefriergewebe	40
3.3.2. Aufarbeitung von formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe	40
3.3.3. Hämatoxylin-Eosin-Färbung	40
3.3.4. Immunhistochemie (IHC)	41
3.3.5. Immunfluoreszenz	42
3.3.6. Mikrodissektion	42
3.4. Arbeiten mit RNA	43
3.4.1. RNA-Isolation	43
3.4.2. Reverse Transkription	43
3.4.3. Multiplex SuperScript One-Step RT-PCR	44

3.5.	Arbeiten mit DNA.....	45
3.5.1.	DNA Isolation.....	45
3.5.2.	Herstellung von Agarosegelen	45
3.5.3.	Nested-PCR	46
3.5.4.	Klonierung	46
3.5.5.	Restriktionsverdau	47
3.5.6.	Sequenzierung	47
3.5.6.1.	Sequenzierreaktion.....	48
3.5.6.2.	Gellauf	48
3.5.7.	Spleißvarianten-spezifische quantitative RealTime-PCR.....	49
3.5.8.	Bestimmung von Amplifikationseffizienz und relativer CAR-Expression	50
3.5.9.	Umklonierung	51
4.	Ergebnisse.....	52
4.1.	Isolierung und Klonierung alternativer CAR-Spleißprodukte	52
4.1.1.	Parallelamplifikation aller CAR-Spleißvarianten mittels Nested-PCR.....	52
4.1.2.	Identifizierung von CAR4/6 als neue Rezeptorisoform	53
4.1.3.	Design spleißvarianten-spezifischer Primer für die quantitative RealTime-PCR.....	55
4.1.4.	Bestimmung von Amplifikationseffizienzen der qRT-PCR	56
4.1.5.	Validierung der Reaktionsspezifität.....	57
4.2.	Endogene Expression des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors	57
4.2.1.	CAR-Expression im humanen Normalgewebe.....	57
4.2.2.	CAR-Expression in Zelllinien.....	58
4.2.3.	CAR mRNA-Expression im Verlauf der Zervixkarzinogenese	60
4.2.4.	CAR-Proteinexpression im Verlauf der Zervixkarzinogenese	62
4.3.	Funktionelle Eigenschaften der membranständigen Rezeptorisoformen.....	67
4.3.1.	Transfektionseffizienzen und Zellvitalität.....	67
4.3.2.	Expressionsraten von CAR4/6 und CAR6/7 in transfizierten Zellen	68
4.3.3.	Western Blot	70
4.3.4.	Lokalisation und Antikörperspezifität.....	71
4.3.5.	Proliferation	72
4.3.6.	Migration und Invasion	73
4.3.7.	Adhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix	74
4.3.8.	Ankerungsunabhängiges Wachstum im Weichagar	75
5.	Diskussion	77
5.1.	CAR4/6 im Normalgewebe - funktionelle Relevanz	77
5.2.	CAR4/6-Expression in immortalisierten Zellen und Tumoren der Zervix	82
5.3.	Funktionelle Analysen	87
5.4.	Ausblick	92
6.	Literaturverzeichnis	93

7. Danksagung.....	102
8. Selbstständigkeitserklärung	103
9. Lebenslauf	104
10. Anhang.....	I
10.1. Plasmidvektorkarten.....	I
10.2. Rohdaten der Spleißvarianten-spezifischen quantitativen RealTime-PCR	II
10.3. Abkürzungsverzeichnis	III

1. Einleitung

1.1. Zelluläre Adhäsion

Alle komplexen Organismen bestehen aus verschiedenen Zelltypen. Diese können durch spezifische Anordnung Gewebe ausbilden, welche wiederum die Grundlage für funktionale Organe darstellen. In jedem Fall erfordert solch eine Form der Organisation einen stabilen Zusammenhalt der Zellverbände sowohl untereinander als auch zu extrazellulären Bereichen. Neben Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten sind daher auch Wechselwirkungen zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix (*extra cellular matrix*, ECM), Stroma und Faserproteinen bekannt [1-2]. Eine strikte Regulation aller Adhäsionsprozesse ist vor allem in Phasen der Neu- und Umorganisation von Geweben (Embryonalentwicklung, Wundheilung) von Nöten, um Ablösen und Anheften einzelner Zellen gezielt zu steuern. Fehler innerhalb diesen Systems können sonst Tumorentstehung und -progression unterstützen oder zum Absterben des beteiligten Gewebes führen [3-5]. In ihrer Vielfalt unterscheidet man mehrere Hauptgruppen zellulärer Adhäsion (Abbildung 1.1). Neben Komplexen, welche extrazelluläre Bestandteile mit intrazellulären Filamenten verknüpfen, exprimieren Zellen auch Zelladhäsionsproteine ohne assoziierte Filamente.

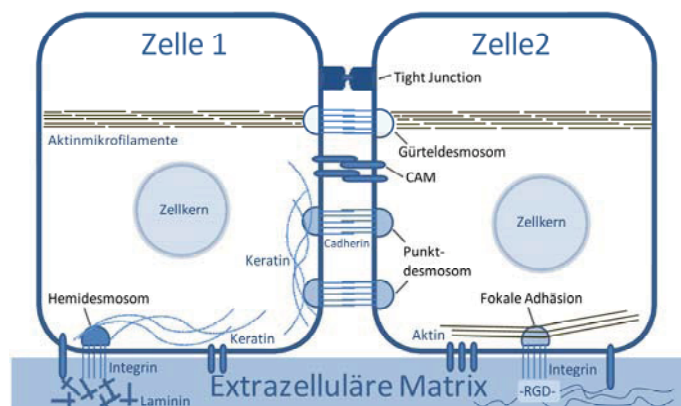


Abbildung 1.1 Übersicht über Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen im epithelialen Gewebeverband. Neben Arealen mit Verknüpfung zum Zytoskelett (Hemidesmosom und Punkt-desmosom → Keratin; Gürteldesmosom und Fokale Adhäsion → Aktin) existieren Zelladhäsionsproteine ohne assoziierte Filamente (cell adhesion molecules, CAM). Homophile und heterophile Kontakte können über Cadherine (Adherence Junctions), Integrine oder andere CAMs ausgebildet werden. Verschlusskontakte (Tight Junctions) bilden eine Membranbarriere.

1.1.1. Adhäsionskontakte mit Verbindungen zum Zytoskelett

Das Zytoskelett eukaryotischer Zellen setzt sich aus drei verschiedenen Komponenten zusammen. Neben den zellstabilisierenden und für intrazellulären Transport zuständigen Mikrotubuli finden sich maßgeblich in Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten involvierte Mikro- und Intermediärfilamente. In epithelialen Zellen bestehen diese vor allem aus Aktin

(Mikrofilament) und Zytokeratinen (Intermediärfilament), andere Kompartimente exprimieren zelltypspezifisch auch Vimentin oder Desmin [6-8].

Ausgehend von adhäsiven Arealen mit Verbindungen zum Zytoskelett unterscheidet man je nach Lokalisation Kontakte zwischen benachbarten Zellen (Gürteldesmosomen und Punktdesmosomen, zusammen Adherence Junctions) und Zell-Matrix-Kontakte (Hemidesmosomen, Fokalkontakte). Gürteldesmosomen - auch zonula adherens genannt - bilden einen vor allem in epithelialen Zellen direkt unter den Tight Junctions angesiedelten Haftgürtel, welcher über intrazelluläres Catenin Aktinfilamente benachbarter Zellen vernetzt. Die Verbindung über Interzellularräume wird durch homophile Interaktion Ca^{2+} -bindender Cadherine vermittelt [9]. Äquivalent werden auch Punktdesmosomen (macula adherens) aneinander grenzender Zellen über Cadherine verbunden, interagieren jedoch intrazellulär über zytoplasmatische Proteinplaques aus Desmoplakin mit Intermediärfilamenten [10]. Im Gegensatz dazu vernetzen Hemidesmosomen und Fokalkontakte Epithelzellen unter Einsatz von Integrinen mit dem umliegenden Bindegewebe. Während $\alpha 6 \beta 4$ -Integrine in Hemidesmosomen extrazelluläres Matrixlaminin über intrazelluläre Ankerproteine an Keratin knüpfen, vermitteln komplexe Fokalkontakte Wechselwirkungen zwischen Aktinfilamenten und Matrixproteinen mit RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp) wie zum Beispiel Fibronektin oder Kollagen [11-12]. Hauptfunktion all dieser Adhärenzverbindungen ist die Festigung des mechanischen Zusammenhalts der Zellen und Schutz gegen Scherkräfte. Jedwede Störungen innerhalb diesen komplexen Systems führen schnell zu Veränderungen des migratorischen Potentials von Zellen und können zur Genese und Progression von Tumoren unterschiedlichster Entität beitragen [13-15].

1.1.2. Tight Junctions

Im apikalen Bereich der Zellmembran sind neben reinen Adhäsionsverbindungen auch Verschlusskontakte aus Tight Junctions (TJ) lokalisiert (Zonula occludens). Diese in schmalen Bändern angeordneten Areale umschließen die Zelle vollständig. Sie agieren als selektive Barriere zum Abschluss des Interzellularraumes nach außen und regulieren die Aufrechterhaltung der Membranpolarität [16-17]. Sowohl bizelluläre als auch trizelluläre TJ bestehen aus integralen Membranproteinen der Occludin- und Claudinfamilie, Mitgliedern der Immunglobulin(Ig)-Familie sowie Trizellulinen, die neben homophilen partiell auch heterophile Wechselwirkungen eingehen (Abbildung 1.2) [18-19].

Im Gegensatz zur reinen Barrierefunktion der extrazellulären Anteile von Occludin, Ig-Proteinen und Trizellulin resultiert die Expression spezieller Claudinisoformen auch in der Generierung transepithelialer Ionen- und Molekülselektiver Poren [20]. Auf diese Weise kann die Expression und Kombination unterschiedlicher Claudinvarianten die Durchlässigkeit

einzelner Epithelien funktionsabhängig regulieren [21]. Mutationen und Fehlregulationen wie am Beispiel der Familiären Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose (FHHNC) zeigen hingegen sehr deutlich, wie schnell es zu einer massiven Beeinträchtigung physiologischer Abläufe kommen kann [16].

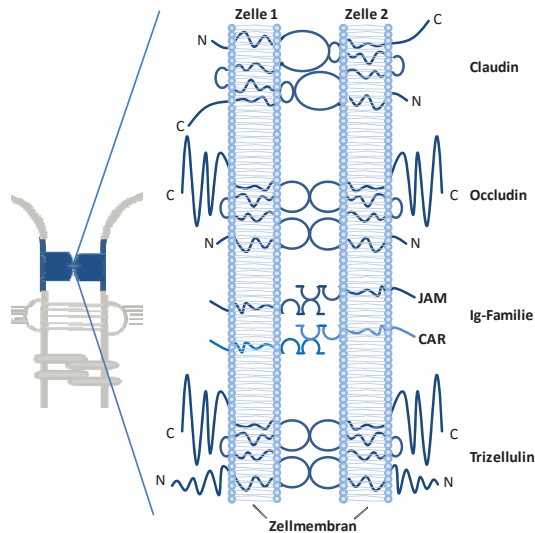


Abbildung 1.2 Überblick der an Tight Junctions beteiligten integralen Membrankomponenten. Neben Occludinen und Claudinen finden sich auch Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie sowie Trizelluline.

Neben integralen Membranproteinen finden sich an TJ auch periphere Plaqueproteine der Membranassozierten Guanylatkinase-ähnlichen Familie (MAGUK-like) wie ZO-1, -2 oder -3 sowie regulatorische Proteine wie ZONAB. Funktionelle Relevanz besitzen diese Komplexe bezüglich der Verankerung von Membrankomponenten untereinander und an das Zytoskelett über Src-Homologie3(SH3)-, Guanylatkinase-ähnliche(GUK)- und PDZ-Domänen [22-23]. Ebenso sind sie Bestandteil von Signaltransduktionskaskaden und haben maßgeblich Einfluss auf Genexpression, Zelldifferenzierung und -proliferation [24-25]. Zusammen genommen ist auch die Komplexität der TJ ein möglicher Risikofaktor für die Tumorentstehung. Veränderungen innerhalb der Occludin- und Claudinexpressionsmuster bereits in frühen Stadien der Karzinogenese sind ebenso beschrieben wie eine Korrelation zwischen verringerter ZO-1-Proteinlevel und Metastasierung [26-27]. Zusammenhänge zwischen der Expression von Proteinen der Ig-Familie und Karzinogenese werden im weiteren Verlauf der Arbeit diskutiert.

1.1.3. Zelladhäsionsproteine

Strukturell weniger auffällig, aber ebenso relevant wie Filament-verknüpfte Zellkontakte sind großflächige Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen über Zelladhäsionsmoleküle (cell adhesion molecules, CAM). Neben den auch in Kontakt zum Zytoskelett stehenden Cadherinen und Integrinen sind diverse Selektine und eine große Gruppe Immunglobulin-

Domänen(Ig)-haltiger Proteine bekannt. Einen guten Überblick über die verschiedenen CAM-Familien gibt Abbildung 1.3.

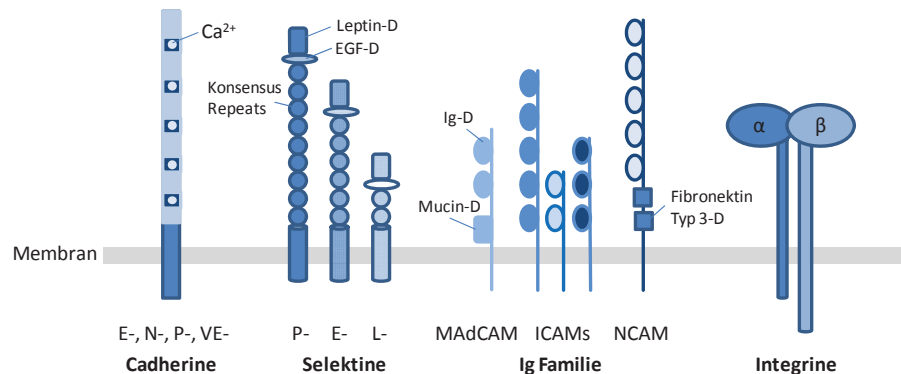


Abbildung 1.3 Überblick über die vier großen CAM-Familien. Neben zahlreichen strukturell homogenen Cadherinen und verschiedenen großen Selektinen existiert eine sehr große Gruppe Immunglobulin-Domänen umfassender Proteine (Ig-Familie) sowie die nur als Heterodimere vorliegenden Integrine. D: Domäne (nach [28]).

Die Familie der Cadherine umfasst neben klassischen (E-, N- oder P-Cadherin) und desmosomalen Untergruppen (Desmoglein, Desmocollin) auch Proto- und atypische Cadherine [29]. Klassische Cadherine als wichtigste Vertreter sind als Typ I und Typ II Transmembranproteine mit funktionell relevanten, hoch konservierten zytoplasmatischen und durch Ca^{2+} verknüpften extrazellulären Cadherin-Sequenzrepeatdomänen charakterisiert [30-31]. Neben homophilen Interaktionen in intrazellulärer cis- und interzellulärer trans-Orientierung sind sie in der Lage, auch verwandte Cadherine zu binden [32]. Im biologischen System haben Cadherine eine Rolle in Ausbildung und Erhalt der Epithelbarriere von Haut und Verdauungsorganen, in der Embryonalentwicklung und der Ausbildung von Axonen im Nervensystem [33-35]. Dysregulationen in Expression, Struktur oder Lokalisation tragen maßgeblich zur Entstehung epithelialer Tumoren hoher Invasivität bei [36-37].

In Leukozyten (L-), Endothelzellen (E-) und Thrombozyten (P-, E-) exprimierte Selektine sind Typ I Transmembran-Glykoproteine mit je zwei bis neun extrazellulären Konsensus-Repeat-Domänen, einer EGF- und einer Leptin-Domäne [38-39]. Nach Stimulation im Rahmen einer Entzündungsreaktion führen sie über heterophile Wechselwirkungen mit Zelloberflächenglykanen zu einem ersten Kontakt zwischen Leukozyt und Gefäßendothel [40]. Diese Eigenschaft befähigt sie, bei fehlregulierter Überexpression ihrer selbst oder entsprechender Liganden mittels Förderung der Extravasation disseminierter Tumorzellen in Tumorgeschehen und Metastasierung einzugreifen [41-42].

Eine sehr umfassende Gruppe von Proteinen mit breit gefächelter struktureller und funktioneller Diversität bildet die Immunglobulin(Ig)-Superfamilie. Allen gemeinsam ist die Expression von über Cysteinbrücken verknüpften, Immunglobulin-ähnlichen Domänen, die

sowohl zu homophilen als auch zu heterophilen Interaktionen befähigt sind [43]. Neben zahlreichen Mitgliedern mit einfacher Transmembrandomäne existieren auch lösliche Isoformen oder Glykosylphosphatidyl-Inositol(GPI)-verankerte Varianten [44-45]. Funktionelle Relevanz besitzen sie in Ausbildung und Strukturierung des Nervensystems (z.B. NCAM-1, L1-Familie, TAG1), Immun- und Entzündungsreaktionen (z.B. ICAM-1, MAdCAM, VCAM-1) sowie embryonaler Entwicklung (z.B. Lrig3) [46-49]. Einflüsse auf das Tumorgeschehen sind auch innerhalb dieser Familie bereits intensiv erforscht [50].

Die als integrale Membranglykoproteine charakterisierten Integrine bilden die letzte große Gruppe transmembranaler Zelladhäsionsmoleküle. Durch nichtkovalente Kombinationen von insgesamt 18 α - und 8 β -Untereinheiten entstehen 24 verschiedene Heterodimere. Sie besitzen die Fähigkeit zur heterophilen Interaktion mit einer Vielzahl von ECM-Proteinen und Mitgliedern der Ig-Superfamilie (Abbildung 1.4, [51]).

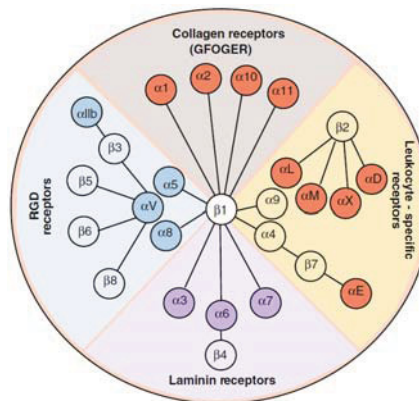


Abbildung 1.4 Rezeptorspezifität der einzelnen Integrinheterodimere. Während die meisten Integrine mit Komponenten der ECM interagieren (Proteine mit RGD-Sequenz, im Speziellen Kollagen, Laminin), bilden sich auch Kontakte zu Leukozyten aus (nach [51]).

Aufgrund der Bidirektionalität dieser Signalrezeptoren können Signale sowohl von innen nach außen (Initiierung einer aktiven Konformation) als auch von außen nach innen (Konformationsänderung nach Ligandenbindung) geleitet werden [52]. Innerhalb biologischer Prozesse spielen Integrine eine wesentliche Rolle in Organogenese, Gewebemodellierung und Leukozytenmigration [53-54]. Doch auch Wachstum, Ausbreitung und Metastasierung von Tumoren sind mittels einzelner oder in Kombination agierender Integrine auf der Ebene zellulärer Migration, Invasion und Angiogenese beeinflussbar [55]. Die Literatur zeigt anhand zahlreicher Beispiele, dass die Expression spezieller Isoformen maßgeblich mit einer schlechten Prognose von Tumoren einher geht [56-57].

1.2. Der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor

Wie der Name impliziert, ist der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor in der Lage, sowohl Mitglieder aus der Familie der Coxsackie- als auch der Adenoviren zu binden und deren Wirkung zu vermitteln. Eben über diese Eigenschaft erfolgte dessen Identifizierung durch Isolierung des ursprünglich als RP-a bezeichneten Rezeptorproteins aus stabilen Komplexen mit B3-Coxsackieviren (CVB3) in HeLa-Zellen [58]. Drei Jahre später offenbarte der gegen RP-a generierte monoklonale Antikörper RmcB einen Schutz gegen die Infektion von HeLa-Zellen nicht nur durch CB3, sondern durch alle sechs Serotypen der Gruppe B Coxsackieviren (CVB1-6) [59]. Jedoch erst knapp zehn Jahre danach konnte RP-a einer cDNA zugeordnet werden, welche nach Transfektion in CHO-Zellen zur Expression eines funktionellen Proteins führte [60]. Dieses Protein besaß die Fähigkeit, neben viralen Infektionen durch CVB3 und -4 auch Adenovirus Typ-2 und -5 induzierte Effekte zu vermitteln. Daher wird RP-a seitdem als Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) bezeichnet.

1.2.1. Genomische Organisation

CAR existiert als Multigenfamilie mit zahlreichen über das gesamte Genom verteilten Pseudogenen [61]. Das auf Chromosom 21q21.1 lokalisierte funktionelle CXADR-Gen (hCXADR) setzt sich aus 8 Exons zusammen und überspannt 80,45 kb [62-63]. Die finale Aufklärung seiner Exonstruktur orientierte sich an Arbeiten bezüglich dem hCXADR-homologen und 8 Exons umfassenden CXADR-Gen im Mausgenom. Anhand aktueller Publikationen konnte so die bis 2010 geltende Meinung widerlegt werden, dass humanes CAR (hCAR) im Gegensatz zu murinem CAR (mCAR) nur von sieben Exons kodiert wird [63]. Der Grund für diese späte Entdeckung liegt in der Präsenz einer ungewöhnlichen Spleißdonorstelle an Position 999 innerhalb von Exon 7 (Abbildung 1.5 A). Neben der am 3'-Ende komplett von Exon 7 codierten Isoform 1 (CAR1) basiert die zweite membranständige CAR-Variante (CAR2) nur partiell auf Exon 7 (5'-Abschnitt 7A in Abbildung 1.5) [64]. Das daran anschließende Exon 8 codiert einen C-Terminus mit alternativer und verkürzter Aminosäuresequenz. Abbildung 1.5 B verdeutlicht dies an mCAR1 und -2, zeigt jedoch auch die offensichtlich große Homologie zu humanem CAR. Alle im weiteren Verlauf der Arbeit gemachten Aussagen bezüglich Volllängentranskript oder CAR6/7 verweisen auf hCAR1.

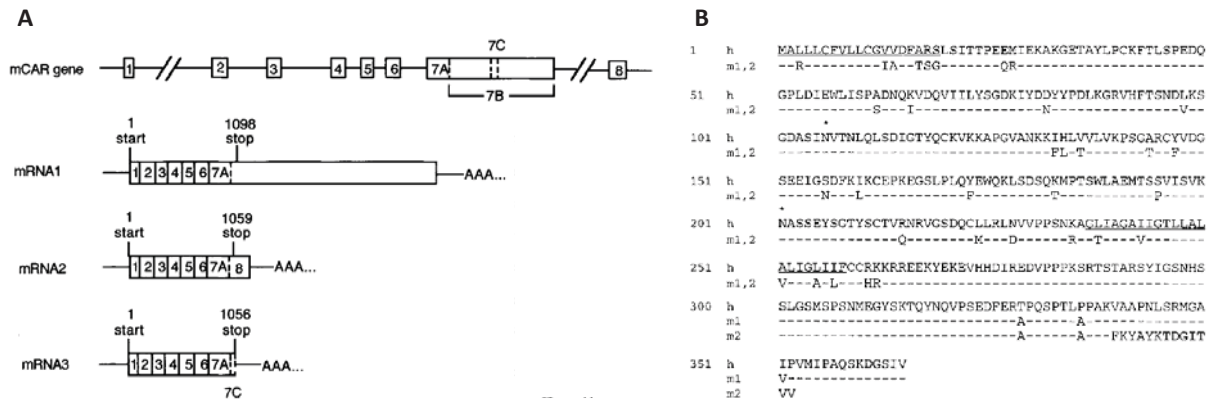


Abbildung 1.5 Genomische Struktur und Proteinsequenz des CXADR-Gens. (A) Zu humanem CAR homologe Exonstruktur des murinen CXADR-Gens (oben). Neben der aus sieben kompletten Exons bestehenden RNA1 existieren noch weitere membranständige Spleißvarianten mit partiellen Verlusten von Exon 7 und/oder Zugewinn eines achten Exons [64]. (B) Vergleich der Proteinsequenzen von humanem CAR1 und murinem CAR1 bzw. -2. Es wird deutlich, dass CAR eine hohe Homologie zwischen beiden Spezies aufweist und in zwei, sich nur im C-Terminus unterscheidenden Varianten existiert. Homologe Aminosäuren sind mit (-) gekennzeichnet, Signalpeptid und Transmembrandomäne sind unterstrichen, potenzielle Glykosylierungsstellen mit (*) markiert [65].

Neben membranständigen CAR-Isoformen können mittels alternativen RNA-Spleißens des CXADR-Gens auch lösliche Varianten generiert werden [66]. Am besten charakterisiert sind CAR4/7, CAR3/7 und CAR2/7 (Abbildung 1.6). Deren Nomenklatur orientiert sich an den nach alternativem Spleißen vorliegenden Exonübergängen. Für CAR4/7 bedeutet dies das Aufeinandertreffen von Exon 4 und 7 unter dem Verlust der Exons 5 und 6. Auf Proteinebene gehen damit der partielle Verlust der extrazellulären Region und der vollständige Verlust der Transmembrandomäne einher, das Protein wird löslich. Äquivalent kodieren auch CAR3/7 und CAR2/7 keine Transmembrandomäne und büßen zunehmende Anteile der extrazellulären Region ein. Im Falle all dieser löslichen CAR-Varianten führt die Entfernung einzelner Exons zu einer Verschiebung des Leserasters und der Etablierung vorzeitiger Stoppcodons [66].

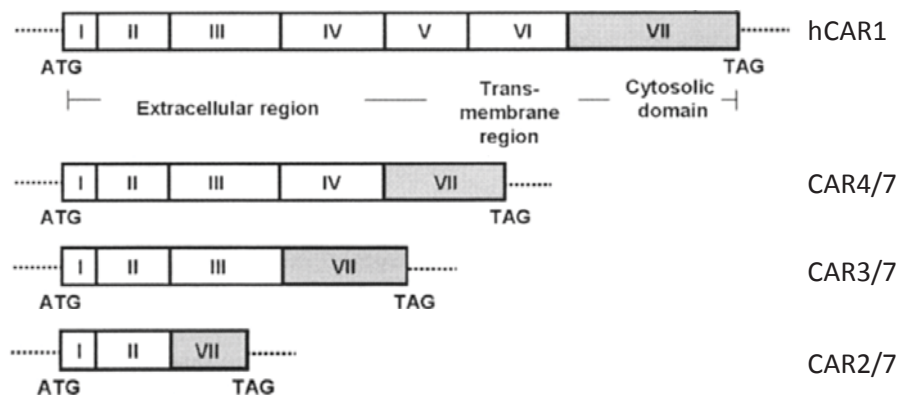


Abbildung 1.6 Vergleich der Exonstruktur alternativ gespleißter, löslicher CAR-Isoformen mit hCAR1. Während das Vollängentranskript für eine große extrazelluläre Region, eine Transmembran- und eine zytoplasmatische Domäne kodiert, resultiert das Ausspleißen von Exon 6 im Verlust der membranalen Lokalisation. Weiterhin verlieren CAR4/7, CAR3/7 und CAR2/7 zunehmende Anteile der extrazellulären Region (modifiziert nach [66]).

1.2.2. Transkriptionale Regulation

Veränderungen in der Menge eines zellulären Proteins können auf mehrere Arten induziert werden. Neben seinem direkten Abbau oder Änderungen innerhalb der posttranskriptionalen Regulation ist das Eingreifen auf transkriptionaler Ebene ein häufiges Ereignis. Hierbei spielen Promotor, Bindestellen für Transkriptionsfaktoren sowie mögliche DNA-Enhancer- oder Silencersequenzen vor oder nach dem Gen eine entscheidende Rolle. Mittels Analyse der 5'-untranslatierten Region (UTR) des CAR-Gens konnte trotz Abwesenheit einer Promotor-typischen TATA-Box die CAR-Promotorregion auf 186 Nukleotide (Position - 400 bis - 585) eingegrenzt werden [67]. Innerhalb der 5'-UTR fanden sich mehrere potenzielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen unter anderem für E2F und c-jun sowie eine mutmaßliche Silencersequenz (Position - 18 bis - 127). Anhand urogenitaler Tumorzelllinien wurde eine Korrelation zwischen Promotoraktivität und CAR-Proteinexpressionslevel eindeutig belegt [67]. Die Untersuchung epigenetischer Kontrollmechanismen im Promotorbereich ergab keine Relevanz bezüglich DNA-Methylierung, konnte jedoch Acetylierungseffekte bestätigen. Ein Anstieg der CAR-Expression nach Inhibition der Histondeacetylase (HDAC) basiert auf einer Auflockerung der Chromatinstruktur auf Höhe des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor-Promotors durch stabile Acetylierung des Histons H4 [67]. Bisher weniger detailliert verstanden ist der Zusammenhang zwischen reduzierter Signaltransduktion über den MAP-Kinase-Weg und gesteigerter Expression von CAR [68]. Ebenfalls beschrieben ist eine verringerte CAR-Expression im Kontext der TGF β -vermittelten Umwandlung von epithelialem zu mesenchymalem Gewebe (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT) im Verlauf der Tumorgenese [69]. Auch Entzündungsprozesse resultieren in messbareren Änderungen der CAR-Level. Während in akuten Phasen Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interferon- γ (IFN- γ) eine Senkung der Expression hervor rufen, führt der Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) nach Abklingen der Entzündungsreaktion zu einem zeitlich verzögerten Anstieg der CAR-Expression [70-71]. Mögliche Funktion hierbei könnte die Einflussnahme auf Gewebeneuorganisation sein. Über die all diesen Prozessen detailliert zugrunde liegenden molekularen Mechanismen ist bisher nur wenig bekannt.

1.2.3. Proteinstruktur und zelluläre Lokalisation

Der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor gehört zur großen Familie der Immunglobulin-ähnlichen Proteine. Die cDNA des Vollängentranskripts kodiert für ein 365 Aminosäuren (*amino acids*, AA) großes Produkt bestehend aus einem 19 AA umfassenden Signalpeptid, einer 216 AA großen extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne von 23 AA Länge sowie einem aus 107 AA zusammengesetzten, zytoplasmatischen Anteil (Abbildung 1.7 A). Eine Zugehörigkeit zur Ig-Superfamilie ergibt sich aus der extrazellulären Proteinstruktur. Diese beinhaltet zwei, durch Disulfidbrücken stabilisierte, Ig-ähnliche Domänen mit

unterschiedlichen Faltungsmotiven und der Fähigkeit zur Dimerisierung. Während homophile Wechselwirkungen beide Domänen umfassen, können heterophile Interaktionen auch von D2 allein ausgebildet werden [43]. Die membrandistal lokalisierte V-Domäne (D1) ähnelt der variablen Domäne von Immunglobulinen, die proximale C2-Domäne (D2) gleicht eher deren konstanter Region [72-73]. In beiden findet sich jeweils eine putative Glykosylierungsstelle (N106 und N201) mit funktioneller Relevanz [74]. Ebenfalls funktionell wirksam werden kann der zytoplasmatische C-Terminus. Dieser enthält neben einem Palmitoylierungsmotiv mehrere Phosphorylierungsstellen sowie eine PDZ-Bindedomäne und ist zwischen Ratte, Kaninchen, Schwein und Mensch zu 95 % konserviert [75-77].

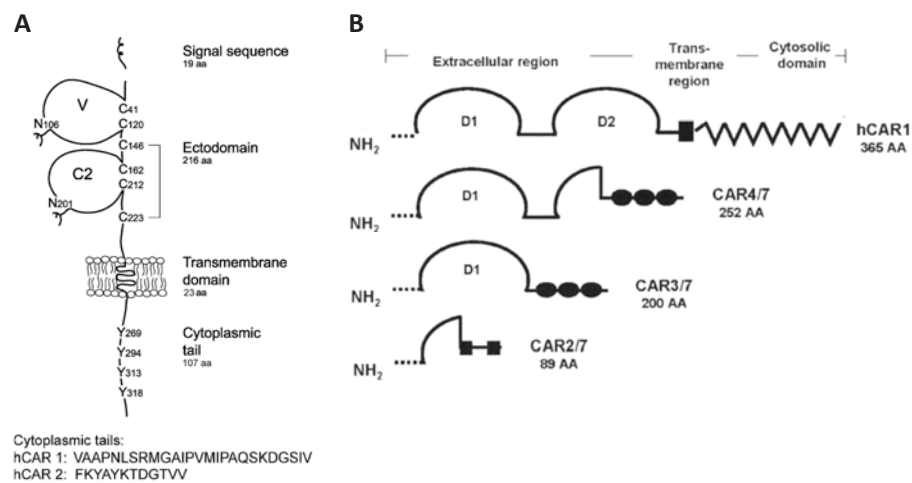


Abbildung 1.7 Spleißvarianten-abhängige Proteinstruktur des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors. (A) Das Vollängentranskript kodiert für ein membranständiges Protein mit kurzem zytoplasmatischen Schwanz (alternativer C-Terminus zwischen hCAR1 und hCAR2) und zwei extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen (nach [78]). (B) Neben hCAR1 existieren drei, mittels alternativer Spleißvorgänge generierte Varianten des Rezeptors, die durch Verlust der Transmembrandomäne in löslicher Form vorliegen (modifiziert nach [66]).

Parallel zu beiden membranständigen Isoformen hCAR1 und hCAR2 generieren alternative Spleißvorgänge verkürzte CAR-cDNAs. Diese kodieren für die löslichen Varianten CAR4/7, CAR3/7 und CAR2/7 mit alternativen C-Termini, partiell verkleinerter extrazellulärer Domäne und ohne transmembranalen Anteil (Abbildung 1.7 B, [66]). Diese Proteine werden nach Synthese von der Zelle sezerniert, sind jedoch in der Lage, mit den verankerten Varianten zu interagieren und diese funktionell zu beeinflussen.

CAR1 als Komponente der Tight Junctions polarisierter Zellen kolokalisiert mit weiteren TJ-Proteinen wie ZO-1 in speziellen lipidreichen Membranmikrodomänen basolateraler Orientierung [63, 79]. Relevanz für diese zelluläre Lokalisation besitzt neben der Transmembranregion vor allem der zytoplasmatische Anteil des CAR-Proteins. Sowohl die allein über GPI-Anker mit der Membran verbundene extrazelluläre Domäne als auch das in zytoplasmatischen Bereichen mutierte Vollängentranskript führen zu einer apikalen CAR-

Expression [80]. Partieller oder vollständiger Verlust der extrazellulären Domäne und damit einhergehende Einschränkungen bei der Interaktion mit benachbarten Zellen resultieren ebenfalls in einem Wechsel von überwiegend lateraler (Wildtyp-CAR) zu diffuser (Verlust beider Domänen) Expression an der Zelloberfläche [81]. Eine Palmitoylierung der Cytosine 259 und 260 bewirkt die Stabilisierung der membranalen Lokalisation [75]. Aktuelle Arbeiten zur Expression von hCAR2 belegen dessen apikale Expression im Epithel der Atemwege, die löslichen Isoformen werden - wie bereits erwähnt - von den Zellen sezerniert [63, 66]. In nicht-polarisierten Zellen wie Kardiomyozyten kann CAR ebenfalls peripheren Zell-Zell-Kontakten zugeordnet werden und kolokalisiert mit Integrinen [82].

1.2.4. Gewebeverteilung und Regulation

Bezüglich CAR-Expression im humanen Gewebe erfolgten bereits systematische Analysen auf mRNA-Ebene. Einhergehend mit der hohen Anfälligkeit von Herz, Hirn und Pankreas für CB3-Infektionen finden sich in diesen Geweben die höchsten Level an CAR1-mRNA unterschiedlicher Größe [65, 83]. Während die Lunge als ein Ziel CAR-vermittelter Adenovirusinfektionen nur eine sehr schwache Expression aufweist, zeigen Leber, Dick- und Dünndarm, Hoden sowie Prostata deutlich stärkere mRNA-Signale. Äquivalente Gewebearrays bezüglich Proteinexpression sind in der Literatur nicht zugänglich. Die Betrachtung verschiedener muskulärer Verbindungen ergab den Nachweis des CAR-Proteins sowohl im Herzen als auch der Skelettmuskulatur [84]. Ebenso existieren Daten zur Existenz von CAR in unterschiedlichen Regionen des Nervensystems sowie dessen Expression in gastrointestinalen Geweben und Endothelzellen von Pankreas und Blutgefäßen [85-87]. Neben polarisierten Epithelien weisen auch ausgereifte Spermien nachweisbare endogene Level membranständigen CARs auf [63, 88]. Die Detektion einzelner löslicher Isoformen erfolgte bisher ebenfalls nur auf mRNA-Ebene und gelang in Herz, Hirn, Plazenta, Lunge, Leber, Niere und Bauchspeicheldrüse [89]. Die Arbeitsgruppe um Reimer quantifizierte alle drei löslichen Varianten im Ovar und der Brustdrüse [90-91].

Während embryonaler Entwicklung und Gewebemodellierung ändert sich die CAR-Expression drastisch. Hohe CAR-Level in der frühen fötalen Phase sinken innerhalb der ersten Lebensabschnitte signifikant, können jedoch im Zuge von Gewebeneu- und -umorganisation wieder ansteigen [92]. So sind, basierend auf einer hohen CAR-Expression bis sieben Tage postnatal, embryonale Mausneuronen wesentlich empfänglicher für eine CB5-Infektion als deren ausgereifte Form [93-94]. Ein vor Entwicklungstag 10 (E10) durchgeführter CAR-Knock-out in Mäusen führt zu embryonaler Letalität auf Basis kardialer Defekte, ein Knock-out nach E11 hingegen resultiert im Auswachsen der Tiere ohne größere, das Herz betreffende Probleme [95]. Diese Daten unterstreichen die elementare Rolle von CAR in der frühen Entwicklung komplexer Organismen. Aber auch Prozesse wie

Wundheilung und Geweberegeneration korrelieren mit einem Anstieg der CAR-Expression. Belegt wurde dieser unter anderem nach Myokardinfarkt, an definierten Stellen gebrochener Knochen oder in regenerierenden Muskelzellen [92, 96-97]. Zahlreiche äquivalente Beispiele hierfür stützen Vermutungen einer Beteiligung von CAR an einer Vielzahl dieser Effekte.

1.2.5. Funktion und Interaktionspartner

1.2.5.1. CAR als Zelladhäsionsprotein

Seinen Einfluss auf embryonale Entwicklung und Gewebeorganisation macht CAR in erster Linie über Veränderungen innerhalb zellulärer Adhäsionsprozesse geltend. Über Interaktionsstudien mit Tight Junction-Komponenten wie ZO-1 und Occludin konnte dessen Lokalisation an TJ verifiziert werden [98-99]. Dort angesiedelte stabilisierende Proteine wie die Membran-assoziierten Guanylatkinase MAGI-1, PICK-1 (protein interacting with C-kinase-1), PSD-95 (postsynaptic density 95) sowie das Multi-PDZ-Domänen-Protein MUPP-1 stehen ebenfalls mit CAR in Verbindung [76, 100] (Abbildung 1.8). Neben reiner Adhäsion reguliert CAR innerhalb der TJ partiell auch die epitheliale Passagen von Ionen und Makromolekülen [99].

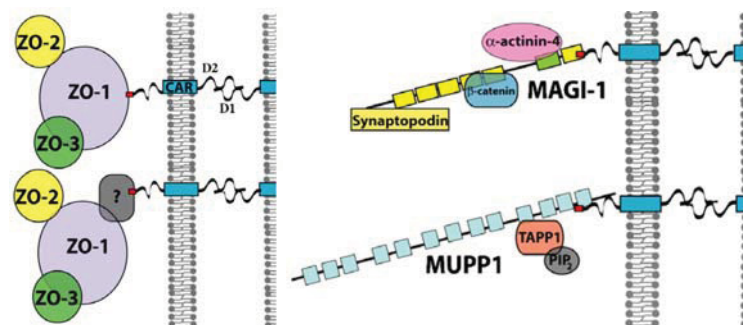


Abbildung 1.8 Übersicht über TJ-assoziierte Interaktionspartner von CAR. Neben direkten oder indirekten Wechselwirkungen mit ZO-1 interagiert CAR in direkter Form mit MAGI-1 und MUPP-1 (modifiziert nach [101]).

Nahezu alle Adhäsion-beeinflussenden Interaktionen zu anderen Proteinen basieren auf Vorhandensein des zytosomatischen Anteils von CAR. Jedoch auch der Verlust der extrazellulären Domäne führt zu einer reduzierten Adhäsion und damit einhergehender signifikant reduzierter Verklumpung von CHO-Zellen [81]. Dies basiert auf der verringerten Stabilität oder gar des Verlusts von CAR-CAR-Homodimeren beziehungsweise Heterodimeren zu Mitgliedern der JAM-Familie [88].

Neben Wechselwirkungen innerhalb von TJ interagiert CAR vor allem in nicht-polarisierten Zellen auch mit lokal weniger begrenzt exprimierten Proteinen. Große Relevanz besitzt die direkte Interaktion des Rezeptors mit den Zytoskelettkomponenten Tubulin und Aktin. CAR-Expression führt zu verstärkter Aktinbündelung *in vitro* und reduziert über Wechselwirkung

mit Tubulin die zelluläre Migration von Gliomazellen [102-103]. Zahlreiche funktionelle Analysen belegen im Gegenzug eine, mit Verlust von CAR einhergehende Steigerung von Migration, Invasion und Zellwachstum. Eine Korrelation zu Wachstumsvorteilen CAR-negativer Tumoren kann gezogen werden [104-105]. Diesbezüglich ebenfalls relevant ist die kürzlich beschriebene Interaktion der extrazellulären D2-Domäne mit Fibronectin [43]. Im biologischen System wird so die Anheftung CAR-exprimierender Zellen an die extrazelluläre Matrix gesteuert. Durch CAR-Verlust induzierte reduzierte Adhäsion an die ECM unterstützt das Ablösen von Zellen aus Gewebeverbänden, jedoch auch aus Tumoren. Für einen möglichen Einfluss des Rezeptors auf das Immunsystem spricht die Vielzahl durch virale Infektionen hervor gerufener Entzündungen überwiegend CAR-positiver Gewebe sowie ein nachweislicher Anstieg der CAR-Expression nach experimentell induzierten Entzündungsreaktionen [106-107]. Daten zur Interaktion zwischen CAR und IgM bzw. IgG stützen diese These [108]. Die molekularen Grundlagen sind bisher jedoch unbekannt. Am atrioventrikulären Knoten muriner Herzen konnte gezeigt werden, dass CAR auch in der Lage ist, einen Komplex mit dem Gap Junction-Protein Connexin-45 (Cx45) auszubilden [109]. Inwieweit diese Interaktion bezüglich der beobachteten Änderungen in der CAR-Expression nach veränderter atrioventrikulärer Reizleitung relevant ist, bleibt abzuwarten. Ein weiterer, nicht nur an TJ lokalisierter CAR-Ligand ist die E3-Ubiquitinligase LNX (Ligand-of-Numb protein-X) [110]. Deren Substrat NumB agiert als Inhibitor des Notch-Signalweges. Unter Berücksichtigung der Beteiligung von sowohl CAR als auch Notch an einer Vielzahl histogenetischer Prozesse, scheint ein CAR-vermittelter Einfluss auf Notch-Signaltransduktion denkbar.

1.2.5.2. CAR als viraler Rezeptor

Neben zahlreichen körpereigenen Liganden agiert CAR auch als Rezeptor für Coxsackieviren vom Typ B (CVB1-6) sowie für zahlreiche Adenovirus-Serotypen A und C - F. Erstere sind unbehüllte Einzelstrang-RNA-Viren aus der Familie der Picornaviridae. Eine Infektion mit Coxsackieviren bildet die Basis zahlreicher Krankheitsbilder wie Meningoenzephalitis, akuten Entzündungen des Herzens oder Pankreatitis [111-112]. Wesentlich für diese Effekte ist die membranständige Lokalisation der Virus-Rezeptoren. Sowohl CAR als auch DAF (decay-accelerating factor) als Ko-Rezeptor für CVB1, 3 und 5 sind in löslicher Form in der Lage, reversible (DAF) oder irreversible (CAR) Komplexe mit CVB3 auszubilden und darüber virale Myokarditis und Pankreatitis in Mäusen zu verhindern [113]. Beide Proteine binden als Dimere CVB3 mit wesentlich höherer Affinität als in monomerer Form. Abbildung 1.9 zeigt ein Modell des Infektionsweges von CVB3 über DAF und CAR. Die Bindung von CVB3 führt über Clusterbildung von DAF zur Aktivierung der Kinasen Abl und Fyn. Abl-vermittelte Umorganisation von Aktinfilamenten ermöglicht CVB3 den Eintritt in die TJ und Interaktion mit CAR. Deren Wechselwirkung induziert die

endozytische Aufnahme des Viruspartikels, welcher durch Phosphorylierung von Caveolin-1 seitens Fyn ins Zytoplasma übergehen kann [114].

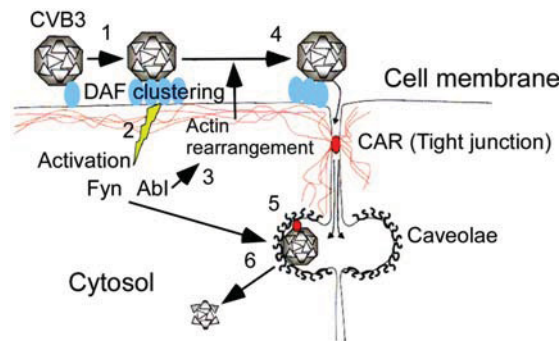


Abbildung 1.9 Infektionsweg des Coxsackievirus B3 (CVB3) an epithelialen Zellen. CVB3-Bindung führt zur Clustering von DAF (1) und Aktivierung von Abl und Fyn (2). Abl vermittelt die Umorganisation von Aktin (3) und ermöglicht dadurch die Interaktion zwischen CVB3 und CAR (4). Nach Endozytose der kompletten Komplexe (5) bewirkt die Phosphorylierung von Caveolin-1 die Freigabe des Viruspartikels (6) (nach [114]).

Adenoviren (Ad) hingegen sind unbehüllte DNA-Doppelstang-Viren aus der Familie der Adenoviridae. Diese verursachen neben meist kurzen respiratorischen, hepatischen und gastrointestinalen Infektionen ohne Langzeitfolgen auch potenziell zu beeinträchtigter Sehkraft führende Infektionen der Augen [115]. In der Medizin wurden vor allem AdC2 und AdC5 häufig als Vektoren für Vakzine oder in der Gentherapie von Tumoren eingesetzt [116-117]. Relativ schnell auftretende Probleme wie die Neutralisierung der Vektoren mittels AdC-Typ-spezifischen zelleigenen Antikörpern, Anreicherung der Vektoren in der Leber statt in den Zielgeweben sowie ineffiziente Transduktion polarisierter Epithelien erforderten jedoch Alternativen. Neben CAR wurden zahlreiche anderen Infektionswege für Adenoviren identifiziert (Abbildung 1.10 A).

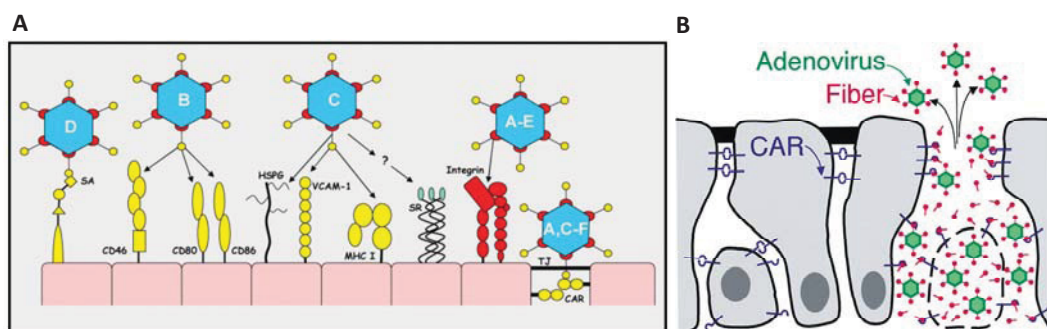


Abbildung 1.10 Infektion und Sezernierung von Adenoviren. A: Neben CAR stehen den Viren vielfältige Rezeptoralternativen zur Verfügung. Zusammengefasst sind das Sialinsäure (SA), CD46, CD80, CD86; Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG), VCAM-1, Hauphistokompatibilitätskomplex-1 (MHC-1), Scavenger-Rezeptoren (SR) und Integrine. Die Bindungen erfolgen über den Faserknopf (gelber Kreis), den Faserschaft (schwarze Linie) oder dem RGD-Motiv der Penton-Basis (rotes Oval) (nach [118]) B: Mögliche Interaktion zwischen Ad-Fasern und CAR auf basaler Seite der TJ resultiert in einem Verlust der transepithelialen Barriere und der Sezernierung von Viruspartikeln (nach [119]).

Ein Wechsel zu anderen Ad-Typen sowie die Verwendung chimärer oder nicht-humaner Vektoren erweitern das Einsatzgebiet bis heute. Bezüglich der Funktion von CAR im Infektionszyklus der Adenoviren existieren immer mehr Beweise dafür, dass CAR *in vivo* nicht den primären Rezeptor für diese Viren darstellt. Ein Aspekt hierfür ist die fehlende Korrelation zwischen CAR-mRNA-Expression und den primären Adenovirus-Zielzellen (z.B. Atemwege, Leber, Lymphozyten) [83]. Zum zweiten wurde gezeigt, dass ein modifizierter Adenovirus-Vektor ohne CAR-Affinität identische Gewebe infiziert wie dessen Wildtyp-Form [120]. Und schlussendlich konnte von der Arbeitsgruppe um Walters festgestellt werden, dass das Faserprotein der Viren TJ-CAR aus basaler Richtung binden und damit die transepitheliale Barriere aufheben kann (Abbildung 1.10 B; [119]). Neu gebildete Viren können so über die apikale Seite der Membran sezerniert werden. All diese Arbeiten deuten an, dass andere Ad-Interaktionspartner wie CD46, Sialinsäure oder Integrine bevorzugt als Rezeptoren charakterisiert werden sollten und CAR eher eine Rolle in der Verbreitung neuer Viruspartikel zukommt.

1.2.6. CAR in der Tumorbilogie

Im Hinblick auf adenovirale Vektoren als Werkzeug der Gentherapie existieren zahlreiche Arbeiten zur Rezeptorexpression an Tumoren unterschiedlichster Entität. Unter der ursprünglichen Annahme, CAR stelle den primären Rezeptor dar, erfolgte hierfür zu Beginn des 21. Jahrhunderts auch dessen Untersuchung. Der allgemeine Konsens dieser Arbeiten bestand in einer Korrelation zwischen CAR-Expression und Transduktionseffizienz [121-122]. Folgepublikationen beziehen sich jedoch nahezu ausschließlich auf alternative Rezeptoren und begrenzen den Nutzen von CAR [123]. Diese Einschränkung beruht auch auf der Beobachtung einer häufig verminderten Expression von CAR1 im Verlauf der Tumorprogression. Beispiele immunhistochemisch untersuchter Blasenkarzinome sowie mittels verschiedenster molekularbiologischer Methoden analysierter Gliomzelllinien und Astrozytomen belegen reduzierte CAR-Proteinlevel in hochgradigen Tumoren, verringerte Sensitivität CAR-negativer Zelllinien auf adenovirale Infektionen und schnelleres Wachstum CAR-negativer Xenotransplantate im Mausmodell [124-125]. Ektopische Expression des Rezeptors in CAR-negativen Blasenkarzinom-Linien verlangsamt deren Wachstum *in vitro* und *in vivo*, CAR-Knockout in Ösophaguslinien erhöht Proliferation, Migration und Invasion dieser Zellen [126-127]. Dass diese Ergebnisse gewebespezifisch sind und nicht für alle Tumorentitäten verallgemeinert werden können, zeigt unter anderem die Arbeit von Giaginis et al. [128]. Am Beispiel maligner Schilddrüsenläsionen erfolgte der Beleg, dass auch positive Korrelationen zwischen CAR-Expression und Entartung eines Gewebes möglich sind. Durch Anwendung immunhistochemischer Methoden, die nicht zwischen einzelnen Rezeptorisoformen differenzieren, wird aus dieser Arbeit jedoch leider nicht ersichtlich, inwieweit CAR1 allein oder in Kombination mit alternativen Varianten an diesem Ergebnis

beteiligt ist. Ebenfalls eine Zunahme der CAR1-Expression, auch auf mRNA-Ebene, zeigt sich in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen und Tumoren der Brust [129-130]. Korrelationen mit Metastasierung als Prognosekriterium gehen häufig mit heterogenen Ergebnissen einher ([105, 129-131]), Arbeiten zum metastatischen Potenzial CAR-überexprimierender Zelllinien belegen eine mit CAR-Expression einhergehende Reduktion der Metastasierung [132]. Eine direkte Analyse der CAR-Expression innerhalb nicht ektopisch induzierter Metastasen wurde bis zum heutigen Tag jedoch nicht publiziert. Auf diesem Gebiet sind daher umfassende Arbeiten sowohl an Lymphknoten- und Fernmetastasen als auch bezüglich in Blut oder Lymphe disseminierte Tumorzellen denkbar.

1.3. Humane Papillomviren (HPV)-induziertes Zervixkarzinom

1.3.1. Das Zervixkarzinom

Mit 530.000 Neuerkrankungen und 275.000 Todesfällen jährlich stellt das Zervixkarzinom (CxCa) die zweithäufigste Krebserkrankung von Frauen weltweit dar (altersstandardisierte Daten, GLOBOCAN, 2008). Hierbei ergeben sich auf Basis unterschiedlicher Entwicklungslevel einzelner Regionen erschreckende Unterschiede in Inzidenz und Mortalität. Während die Europäische Union durchschnittlich nur 6 % der Neuerkrankungen (Inzidenz < 10/100.000) und 5 % der Todesfälle (Mortalität 2 - 5/100.000) verzeichnet, erkranken in Entwicklungsländern 453.000 Frauen jährlich (20 - 30/100.000), 242.000 Frauen sterben (10 - 25/100.000). Für Deutschland registrierte die WHO 4440 Erkrankungs- und 2018 Todesfälle im Jahr 2008 (Inzidenz 6,9/100.000; Mortalität 2,3/100.000). Da sich im Laufe der Zervixkarzinogenese ein Großteil früher Tumorstufen zurückbildet oder zumindest persistiert, kann von einer weit höheren Inzidenz dieser prämaligen Entartungen ausgegangen werden [133]. Zwischen 50 % und 80 % aller Frauen infizieren sich im Laufe ihres Lebens mindestens ein Mal mit genitalen HPV, den Hauptinduktoren zervikaler Tumoren [134]. Durchschnittlich liegt die HPV-Prävalenz zytologisch unauffälliger Frauen bei 11,7 %, mit Peaks in der Altersgruppe unter 25 Jahre und über 45 Jahre [135]. Zytologisch auffällige zervikale Tumoren zeigen sich laut Robert-Koch-Institut (RKI) überwiegend zwischen dem 40. und 59. Lebensjahr. An der in situ-Form erkranken Frauen im Mittel mit 36 Jahren, am invasiven CxCa mit durchschnittlich 52 Jahren (RKI). Dieses Kollektiv setzt sich dann zu 70 - 80 % aus Plattenepithelkarzinomen und 10 - 15 % aus Adenokarzinomen zusammen [136]. Andere Tumorentitäten wie zum Beispiel kleinzellige Karzinome sind selten. Neben der zwingend vorliegenden Infektion mit HPV existieren einige weitere Begleitfaktoren, die mit erhöhtem Erkrankungsrisiko assoziiert sind. Dazu gehören ein geschwächtes Immunsystem, die ausgeprägte Exposition mit Zigarettenrauch, Begleitinfektionen sexuell übertragbarer Erreger sowie eine hohe Anzahl vorangegangener

Geburten [137-138]. Die Langzeiteinnahme oraler Kontrazeptiva als weiterer Risikofaktor wird diskutiert [139].

Nach der viralen Infektion kommt es in manchen Fällen zur schrittweisen Veränderung von Zellen und Gewebestrukturen im Epithel. Es entstehen zervikale intraepitheliale Neoplasien (*Cervical Intraepithelial Neoplasia*, CIN). Hierbei unterscheidet man je nach Anteil dysplastischer Zellveränderungen zwischen niedriggradigen CIN1, mäßig dysplastischen CIN2 und hochgradig entarteten CIN3 (Abbildung 1.11). Deren Gemeinsamkeit besteht in einer nicht-invasiven Pathologie ohne Durchbruch durch die Basalzellschicht. Mit zunehmendem Fortschreiten der Dysplasie steigt der prozentuale Anteil HR-HPV-positiver Fälle, die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Remission sinkt von 55 % (CIN1) auf 10 % (CIN3) [133]. Dies beruht auf dem onkogenen Potenzial humaner HR-Viren. Durch eine temporale und spatiale Deregulation hoch onkogener viraler Proteine (E6/E7) kommt es zu DNA-Schäden sowie zur Integration des ringförmigen Genoms (Episom) in die Wirtszell-DNA. Eine normale Zelldifferenzierung wird verhindert, die Zelle transformiert zu einer hyperproliferativen Tumorzelle. Findet in diesem Stadium das Immunsystem keine Möglichkeit mehr, diese Zellen zu eliminieren und kommt es zu weiteren Veränderungen wie dem Zuwachs invasiven Potenzials, durchbricht die Dysplasie die Basalzellschicht und entwickelt sich zum invasiven Karzinom.

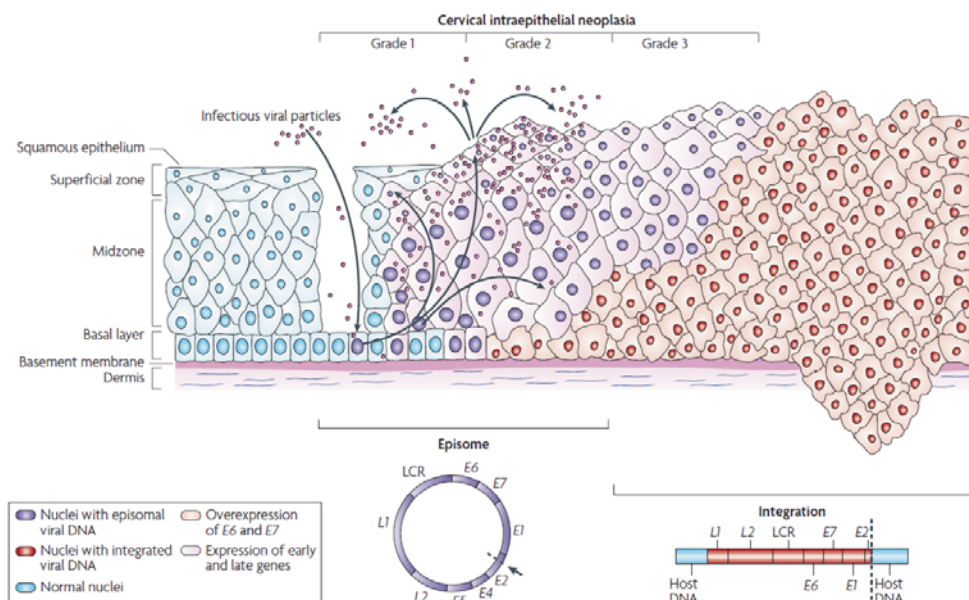


Abbildung 1.11 Modell der HPV-vermittelten Zervixkarzinogenese. Nachdem virale Partikel bevorzugt über Mikroverletzungen ins Epithel eindringen und Basalzellen infizieren, werden vom Episom erst die frühen, im Anschluss die späten HPV-Gene abgelesen und neue Viruspartikel generiert. Bevorzugt durch Deregulation der viralen Onkogene E6 und E7 kommt es zur Integration des viralen Genoms. Eine normale Zelldifferenzierung wird verhindert, die Zelle transformiert zu einer hyperproliferativen Tumorzelle (nach [140]).

Laut Robert-Koch-Institut lag 2006 die 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland zwischen 63 % und 71 %. Eine etwas ältere Studie aus Amerika liefert neben annähernd kohärenten Daten umfassende Aufschlüsselungen nach FIGO-Stadium, Histologie, Differenzierungsgrad, Altersgruppe und Lymphknotenstatus [141]. Nach Verknüpfung der Altersstruktur mit diagnostiziertem FIGO-Stadium ergeben sich Überlebensraten zwischen 99,6 % (FIGO Ia, < 30 Jahre) und 7,1 % (FIGO IV, 70 Jahre und älter) nach 5-jährigem Follow-Up. Geringere Unterschiede zeigen sich zwischen Plattenepithel- und Adenokarzinom (55,7 % versus 47,2 %) sowie unterschiedlichen Differenzierungsgraden (G1 = hoch differenziert, 58 %, G3 = schlecht differenziert, 49,2 %). Den größten prognostischen Wert bezüglich der 5-Jahres-Überlebensrate besitzt der Lymphknotenstatus. Während Tumoren mit histologisch unauffälligen Lymphknoten mit 57,9 % eine eher durchschnittliche Prognose haben, leben nach Lymphknotenbefall nur noch 31,6 % aller Patientinnen 5 Jahre nach Diagnose. Die verhältnismäßig hohe Zahl an Rezidiven in Fällen histologisch unauffälliger Lymphknoten deutet auf ein ineffizientes Staging allein auf Basis der Histologie. Erste Arbeiten zur Korrelation zwischen HPV-Prävalenz in pathologisch tumorfreien Lymphknoten und Krankheitsverlauf zeigen einen Zusammenhang von HPV-mRNA Positivität in Lymphknoten von pN0-Patienten und rezidivierenden Tumoren (unpublizierte Daten, AG Dürst). Neben HPV würden, zusätzlich zur histologischen Analyse, äquivalente alternative molekularbiologische Marker die Diagnose des Nodalstatus auch für Tumoren anderer Entität unterstützen können. Bezüglich der Prävention existieren für das CxCa bereits sehr effiziente primäre (Impfung gegen häufigste HR-HPV-Typen) und sekundäre Maßnahmen (zytologisches Screening). An zusätzlichen Markern, auch für Tumore anderen Ursprungs, wird aktiv geforscht.

1.3.2. Humane Papillomviren

Papillomviren sind unbehüllte, doppelsträngige und hoch wirtsspezifische DNA-Viren aus der Familie der Papillomaviridae. Neben 69 bisher klassifizierten Typen nicht-humaner Abstammung sind aktuell 120 humane Papillomviren (HPV) beschrieben [142]. Einige hiervon sind für die Entstehung gewöhnlicher verhornender Hautwarzen verantwortlich (kutane HPV), andere infizieren bevorzugt Haut und Schleimhaut im Anogenitalbereich (genitale HPV-Typen mukosaler Art). Diese sexuell übertragbare Gruppe unterteilt sich in Niedrigrisiko- (*low risk*, LR) und Hochrisiko- (*high risk*, HR) HPV. Während LR-Viren wie HPV6 und -11 als Hauptursache genitaler Warzen äußerst selten an der Entwicklung von Tumoren beteiligt sind, stehen HR-HPV in direktem und eindeutigen Zusammenhang zur Karzinogenese sowohl im anogenitalen Bereich als auch im Mund- und Rachenraum [143]. Nur ein sehr kleiner Bruchteil der HPV-Infektionen resultiert in der Genese eines Tumors, 99,7 % aller Zervixkarzinome liegt jedoch eine Hochrisiko-HPV-Infektion zugrunde [144]. Im Jahr 2005 gehörten dieser Gruppe laut WHO offiziell die Genotypen 16, 18, 31, 33, 35, 39,

45, 51, 52, 56, 58, 59 und 66 an. Über die Zugehörigkeit anderer HPV-Typen zu diesem Kollektiv wird spekuliert [145-146]. Die Prävalenz HPV16-positiver Tumore hierbei liegt bei etwa 50 - 60 %. Gemeinsam mit HPV18 - mit 10 - 20 % dem zweithäufigsten Hochrisiko-HPV-Typ - induzieren sie etwa 70 % aller zervikalen Karzinome [147]. Ebenfalls verhältnismäßig häufig zu finden sind HPV31, 33, 35, 45, 52 und 58, die gemeinsam weitere 18 % aller HPV-basierten Tumore der Zervix ausmachen. Variationen im Verteilungsmuster einzelner Typen bestehen zwischen Tumoren unterschiedlicher Pathologie, Karzinomen und deren Vorstufen sowie auch regional zwischen verschiedenen Ländern [147]. Während Plattenepithelkarzinome der Zervix in 55 % der Fälle durch HPV16 induziert werden, trifft dies nur in 33 % der Fälle auf Adenokarzinome zu. Im Gegenzug ist HPV18 - im Plattenepithelkarzinom mit 13 % weniger relevant - im Adenokarzinom mit 37 % häufiger vertreten als HPV16. Die Meta-Analyse zeigt weiterhin eine deutlich höhere Relevanz für in Karzinomen unterrepräsentierte Virustypen in Tumorstufen sowie eine Verschiebung HPV16/18-positiver Läsionen zwischen Industriestaaten (74 - 77 %) und Entwicklungsländern (65 - 70 %). Neben Patientinnen mit HPV-positiven Tumoren oder Tumorstufen existieren auch zahlreiche HPV-positive, zytologisch jedoch unauffällige Patientinnen. Die HPV-Prävalenz innerhalb dieses Kollektivs liegt bei durchschnittlich 11,7 % und schwankt regionsabhängig zwischen 1,7 % in Westasien und über 30 % in der Karibik und Ostafrika sowie altersabhängig zwischen 4,2 % (45 - 54 Jahre) und 24 % (unter 25 Jahre) [135]. Trotz unterschiedlicher Verteilungsmuster einzelner HPV-Typen induzieren auch hier die von der WHO als Hochrisikogruppe klassifizieren HPV-Typen etwa 70 % aller HPV-Infektionen.

Das zwischen den einzelnen HPV-Typen hoch konservierte Papillomviren-Genom umfasst etwa 8 kb und unterteilt sich in drei Hauptregionen mit insgesamt 8 offenen Leserahmen [148]. Neben einer Kontrollregion mit regulatorischen Sequenzen (*long control region*, LCR) finden sich sechs früh (*early genes*, E) und zwei spät (*late genes*, L) im viralen Lebenszyklus exprimierte Gene (siehe Abbildung 1.11). Diese werden als polycistronische mRNA transkribiert und unterliegen alternativem Spleißen [149]. Die LCR entspricht einer nicht-kodierenden Region und überspannt die viralen Sequenzen vom Stoppcodon des L1-Gens bis zum Startcodon von E6. Sie ist im HPV-Genom am wenigsten stark konserviert und beinhaltet sowohl auf Wirtsfaktoren als auch auf viral kodierte Transkriptionsfaktoren reagierenden Enhancer-Elemente, den frühen Promotor sowie den Replikationsursprung der viralen DNA. Eine gewebeabhängige Regulation der viralen Transkription in Abhängigkeit vom HPV-Typ ist verantwortlich für Streuungen innerhalb der Transkriptionseffizienzen [150]. Die Expression der frühen Gene E6 und E7 erfolgt in allen HPV-infizierten Zellen. Jedoch einzig HR-E6 und E7 besitzen das onkogene Potenzial zur zellulären Transformation. Durch Kooperation beider Proteine kommt es zur Immortalisierung der Zellen sowie zur Induktion genomischer Instabilität [151-152]. Während E6 den Abbau des Tumorsuppressors p53

vorantreibt und damit zur Anhäufung von DNA-Schäden sowie der Hemmung p53-vermittelter Apoptose führt, besitzt E7 über Interaktionen mit dem Retinoblastomprotein Rb Relevanz in der Zellzyklusregulation. Zusätzlich erhöht E6 über direkte Wechselwirkung mit dem hTERT-Komplex maßgeblich die Aktivität der Telomerase [153]. Die ebenfalls von der Gruppe der *early genes* kodierten Proteine E1 und E2 beeinflussen sowohl die DNA-Replikation als auch die Transkription des HPV-Genoms [154]. E1 bindet - im Komplex mit E2 - mit hoher Affinität an den viralen Replikationsursprung, besitzt Helikase-Aktivität und lokalisiert die zelluläre DNA-Replikationsmaschinerie am viralen Genom. Durch Bindung regulatorischer Elemente innerhalb der LCR beeinflusst E2 in Kombination mit anderen Faktoren die Synthese viraler, aber auch zellulärer mRNA [155-156]. Neben einer Transkriptionsaktivierung, ist im Zellkulturmodell auch eine negative Regulation der mRNA-Synthese seitens E2 belegt [157]. Im weiteren Verlauf stimuliert E5 durch Interaktionen mit den Rezeptoren für EGF, PDGF- β und CSF-1 das zelluläre Wachstum in suprabasalen Epithelschichten [158]. Ein Fusionstranskript aus E1 und E4 akkumuliert in ausdifferenzierten Keratinozyten und ist über Wechselwirkungen mit Keratin an Um- und Abbau des Keratinnetzwerks und damit womöglich auch an der Freisetzung vollständiger Viruspartikel beteiligt [159]. Beide Proteine scheinen eine wesentliche Rolle in der zell-differenzierungsabhängigen viralen Replikation zu spielen und werden im Moment noch detailliert erforscht. In späten Stadien der Infektion interagieren abschließend L1 („major“ Kapsidprotein) und L2 („minor“ Kapsidprotein), bilden ein Kapsid und verpacken die virale DNA [160]. So generieren sie neue infektiöse Viruspartikel, welche in die Superfizialschicht freigesetzt werden.

Im Gegensatz zu Viren anderer Familien ist eine produktive HPV-Infektion hochgradig differenzierungsabhängig und basiert auf der Fähigkeit ihrer Wirtszellen, den Zellzyklus zu durchlaufen [161-162]. HPV infiziert daher bevorzugt die Basalzellschichten epidermaler oder mukosaler Epithelien. Mikroverletzungen im Gewebe und die daraus resultierende Freilegung der basalen Zellen erleichtern diesen Vorgang. Äquivalent zu Adenovirusinfektionen agieren Heparansulfat-Proteoglykane oder Integrine als mögliche Rezeptoren [163-164]. Das in diesem Stadium ringförmig vorliegende HPV-Genom (episomale Konformation) wird in den Nukleus eingeschleust und unter Verwendung zellulärer Transkriptionsfaktoren synchron zum Zellzyklus der Wirtszelle und auf niedrigem Level transkribiert [165]. An dieser Stelle sorgen E1 und E2 für die Replikation und Segregation des viralen Genoms. Teile dieses Zellkollektives gelangen während der normalen Hautreifung in suprabasale Zellschichten. Die Expression der frühen Gene E6 und E7 ermöglicht die Replikation des viralen Genoms in sich nicht mehr teilenden Zellen und verhindert die Apoptose infizierter Zellen. Erst in vollständig ausdifferenzierten Zellen kommt es zur Aktivierung des differenzierungsabhängigen späten Promotors, L1- und L2-

Strukturproteine entstehen und komplette Viruspartikel werden generiert. Mit Erreichen der Superfizialschicht erfolgt deren Freisetzung in das umgebende Milieu. Neben dieser Form der Infektion resultieren vor allem persistierende HR-HPV-Infektionen gelegentlich auch in der Transformation normaler Zellen. Ein deregulierte E6/E7-Expression in proliferativ aktiven Basalzellen wird hiermit in Verbindung gebracht. Während in frühen Tumorstadien die virale DNA noch überwiegend episomal vorliegt, nimmt der Anteil in das Wirtsgenom integrierter viraler DNA mit fortschreitender Tumorentstehung deutlich zu [166].

1.3.3. HPV im Prozess zellulärer Adhäsion

Die beiden Proteine E6 und E7 humaner HR-Papillomviren sind verantwortlich für die Entstehung und Persistenz maligner Zellen. Selbst viele Jahre nach initialer Transformation werden sie gemeinsam auf hohem Level exprimiert. Arbeiten zum onkogenen Potenzial der Einzelproteine offenbarten, dass die alleinige Expression von E7 in transgenen Mäusen die Ausbildung überwiegend gutartiger Wucherungen forciert, E6 hingegen eher die Entwicklung wesentlich aggressiverer Läsionen induziert [167]. Bei der Suche nach molekularen Ursachen, die zu diesem Phänotyp beitragen, wurde eine hoch konservierte Region am C-terminalen Ende von E6 identifiziert, die einzig von HR-HPV kodiert wird - eine PDZ-Bindedomäne (Übersicht in [168]). Über Wechselwirkungen mit dieser werden zahlreiche PDZ-Domänen-umfassende Proteine von E6 gebunden, der Ubiquitinierung zugeführt und abgebaut (Abbildung 1.12 A). Mit MAGI-1, MUPP-1 und PSD95 befinden sich hierunter auch zahlreiche Interaktionspartner des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors.

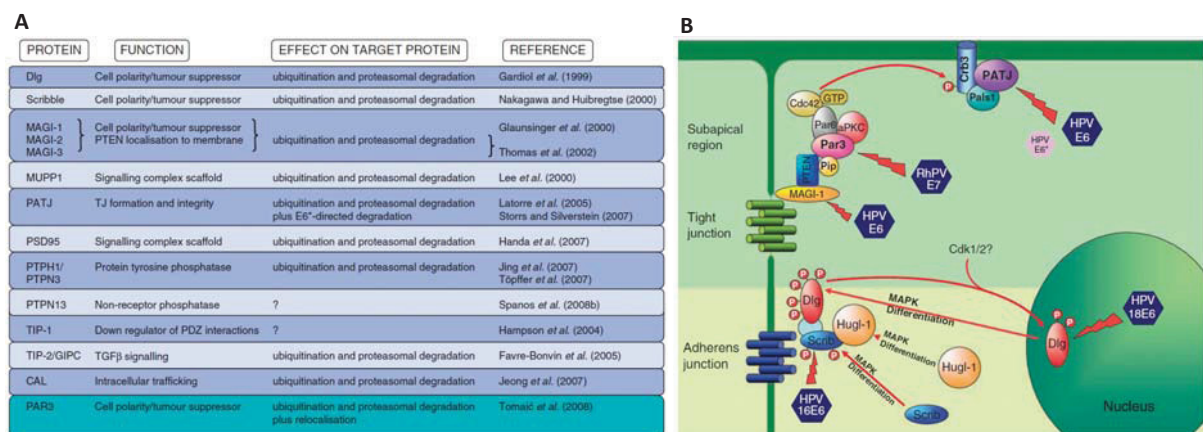


Abbildung 1.12 Ziele des HR-HPV-E6/E7-vermittelten, proteasomalen Abbaus. (A) Zusammenfassung PDZ-Domänen-umfassender Proteine und deren Funktion. (B) Zahlreiche der links aufgelisteten Targets sind maßgeblich in zelluläre Adhäsion involviert (nach [168]).

Neben dem Abbau sind abhängig von der E6-Bindung auch Änderungen der Proteinlokalisierung oder die Blockierung von Interaktionen zwischen Substrat und Ligand denkbar. Beide Prozesse resultieren möglicherweise in veränderter Funktionalität des PDZ-

Proteins. Viele dieser Interaktionspartner sind maßgeblich an der Aufrechterhaltung von Zellpolarität und Zelladhäsion beteiligt und gehen nach Infektionen mit HPV16/18 verloren (Abbildung 1.12 B). Da Adhäsionskomplexe wie z.B. TJ eine wichtige Rolle bei zellulärer Differenzierung und Proliferationsregulation spielen, wird klar, dass deren Verlust einen Vorteil für HR-HPV bietet, die Zellen zu einem malignen Phänotyp zu konvertieren. Aktuelle Arbeiten von Kranjec und Banks zeigen am Modell TJ-freier, HPV-positiver CxCa-Linien, dass E6/E7-Knock-down in einer Generierung neuer TJ resultiert [169]. Sie belegen, dass dieser Effekt allein auf der Neuexpression von MAGI-1 beruht. Andere HR-E6 PDZ-Substrate weisen in diesem Modell eine weniger deutliche Hochregulation nach E6/E7-Knock-down auf.

1.4. Grundlegende Aspekte des alternativen Spleißens

Im Rahmen der Prozessierung transkribierter Vorläufer-mRNAs ist Spleißen ein sehr häufiges Ereignis. Es basiert auf konservierten kurzen Sequenzen am 5'- und 3'-Ende jedes Introns, an welchen über zwei Umesterungen der Exon-Intron-Übergänge das jeweilige Intron als Lassostruktur aus der prä-mRNA entfernt wird. Hierfür bildet sich ein großer Komplex (Spleißosom) aus fünf Urazil-reichen, kleinen nukleären RNAs (snRNA) und daran assoziierten kleinen nukleären Ribonukleoproteinpartikeln (snRNP), der alle relevanten Sequenzen des Introns erkennt und die katalytischen Reaktionen voran treibt [170]. Aufgrund der durchschnittlich sehr langen Introns sowie den eher degenerierten Konsensussequenzen, sind zusätzliche Sequenzinformationen zur eindeutigen Festlegung der Schnittstellen hilfreich. Komplexe Organismen bedienen sich hierbei konservierter exonischer Spleißverstärker-Sequenzen (*exonic splice enhancer*, ESE), welche von speziellen RNA-Bindeproteinen (SR-Proteine) erkannt und gebunden werden [171]. Indem sie das Spleißosom über kooperative Bindungen an einem echten Intron-Exon-Übergang lokalisieren, werden Exons eindeutig markiert und Introns erfolgreich entfernt. Neben konsekutivem Spleißen regulieren Proteine der SR-Familie [Serin (S) / Arginin (R)-reich] auch alternative Spleißmechanismen [172]. Diese Mechanismen verwenden Eukaryoten, um die Anzahl aus einer prä-mRNA resultierender Proteinvarianten zu erhöhen. Auf diese Weise kann aus dem humanen Genom mit nur etwa 33.000 Genen ein wesentlich komplexeres Proteom entstehen. Möglichkeiten hierfür bieten Kassettenexons, welche nur in bestimmte mRNA-Varianten eingebaut werden. Weiterhin kann durch Überspringen von Exons bzw. das Beibehalten von Introns sowie die Verwendung alternativer 5'- oder 3'-Spleißpositionen die Proteinviefalt maßgeblich gesteigert werden. Während Spleißaktivatoren Spleißfaktoren an entsprechende Positionen rekrutieren und deren Assoziation mit der zu entfernenden Sequenz fördern, blockieren Repressoren die Bindung dieser Faktoren auf sterische Weise oder hemmen deren Funktion [173].

Im biologischen System besitzt alternatives Spleißen eine sehr hohe Relevanz. Am Beispiel der Differenzierung embryonaler Stammzellen zu neuronalen oder kardialen Vorläuferzellen wurden maßgeblich unterschiedliche Muster alternativ gespleißter Exonstrukturen beschrieben [174-175]. Hierunter finden sich mit $\alpha 6 \beta 4$ -Integrin und Bestandteilen der ECM auch wesentliche Komponenten der zellulären Adhäsion. In späteren Phasen neuraler Entwicklung zeigt sich ebenfalls eine Regulation alternativ gespleißter CAM [176]. Parallel zu diesen Prozessen belegen zahlreiche Beispiele auch Einflüsse alternativen Spleißens auf die Entstehung und Progression von Krankheiten oder Tumoren. So induziert zum Beispiel HPV eine Hochregulation der SR-Proteine SF2/ASF (splicing factor 2/alternative splicing factor), SRp20 und SC35 in infizierten epithelialen Zellen. Während transiente Infektionen hierfür E2 nutzen, ist die molekulare Grundlage der Hochregulation im Tumor unbekannt [177]. Häufig beschrieben ist eine Korrelation zwischen Expression einer definierten Spleißvariante und zunehmender Invasivität oder Metastasierung von Krebszellen oder dem Verlust der ungespleißten Wildtyp-Isoform in Karzinomen [178-179]. Erste Diskussionen zur Verwendung alternativ gespleißter Isoformen als Tumor- oder Prognosemarker werden geführt [180].

1.5. Zielstellung

Der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor ist ein elementarer Bestandteil zellulärer Adhäsionskomplexe. Er ist an Zell-Zell-Kontakten polarisierter Epithelzellen, aber auch nicht-polarisierter Zellen von Herz oder Nervensystem lokalisiert. Dort greift er über die Regulation der Adhäsion überwiegend in Prozesse der Gewebeneu- und -umorganisation ein. Mit Tumorentstehung und -progression geht seine Expression häufig verloren. Hiervon betroffene Zellen sind durch beschleunigtes zelluläres Wachstum sowie verstärkte Migration und Invasion charakterisiert. Widersprüchliche Arbeiten an Tumoren anderer Entität legen jedoch offen, dass sich das Bild der CAR-Expression im malignen Gewebe wesentlich heterogener darstellt, als angenommen. Somit sollten bisher weniger intensiv auf CAR-Expression hin untersuchte Tumore zusätzlich evaluiert werden. Die bisher wenig untersuchte Existenz alternativer Spleißvarianten und deren Zusammenhang zur Entartung von Zellen geben zusätzliche Ansatzpunkte für weiterführende Arbeiten.

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand daher in der vergleichenden Charakterisierung von CAR4/6 als trunkierte membranständige Spleißvariante mit CAR6/7 als Vollängentranskript des Rezeptors. Als Modell für in CAR-Analysen bisher unterrepräsentierte Tumorentitäten diente das Zervixkarzinom. Nach Isolierung und Identifizierung der neuen Spleißvariante CAR4/6 bestand das erste Ziel darin, eine spleißvarianten-spezifische Nachweismethode zu generieren. Unter Berücksichtigung von Amplifikationseffizienz und Reaktionsspezifität sollten damit im nächsten Schritt Analysen zur endogenen Expression der mRNA von CAR6/7 und CAR4/6 in humanen Normalgeweben, diversen Zelllinien sowie mikrosezierten Tumorarealen von Plattenepithelkarzinomen der Zervix erfolgen. Mittels eines Vergleichs der CAR-mRNA-Expressionslevel beider Varianten waren Rückschlüsse auf Abhängigkeiten zu FIGO-Stadium oder Nodalstatus angedacht, welche im Anschluss mit Analysen der Proteinexpression validiert werden sollten. Auf funktioneller Ebene sollten Assays zur Evaluierung von Einflüssen stabiler CAR-Expression auf Proliferation, Migration und Invasion, zellulärer Adhäsion sowie ankerungsunabhängigem Wachstum im Weichagar erste Hinweise auf ein mögliches onkogenes Potenzial der neuen CAR-Variante liefern.

2. Material

2.1. Geräte

Gerät	Bezeichnung/Typ	Hersteller
Ausziehen von Glasspitzen	Typ PN-30	Narishige, Tokio, Japan
Biolmager Platte	BAS SR Imaging Plate	Fujifilm, BRD
Blot-Apparatur	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München, BRD
CO ₂ -Brutschrank	BBD 6220	FormaScientific, Marietta, USA
DNA-Crosslinker	GS Gene Linker	BioRad, München, BRD
Elektrophorese-Netzgerät	Power Pack P25	Biometra, Göttingen, BRD
Elektrophorese-Kammern	DNA/RNA Proteine: MiniVE	Boehringer-Ingelheim, BRD Hoefer, San Francisco, USA
ELISA Reader	Lambda K	MWG-Biotec, Teddington, UK
Filmkassetten	X-OMAT-Kassetten	Kodak, Stuttgart, BRD
Geldokumentationsanlage	DH30/32	Biostep Jahnsdorf, BRD
Hybridisierungssofen	HB1000 Hybridizer	Heraeus Instruments, Hanau, BRD
Kameras	Axiocam PowerShot A640	Zeiss, Jena, BRD Canon, Krefeld, BRD
Messen radioaktiv. Proben	Quick-Count 4000	Bioscan, Washington, USA
Mischgerät	Vortex-Genie2	Scientific Industries, USA
Mikromanipulator		Narishige, Tokio, Japan
Mikroskope	Axioplan 2 Axiovert 135 Axiovert 200M / LSM510 Telaval 31	Zeiss Jena, BRD
Mikrotome	HM 340 E-2 Cryotom SME	Microm, Walldorf, BRD Shandon, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
PCR-Geräte	Mastercycler Gradient 7300SDS	Eppendorf, Hamburg, BRD Appl. Biosystems, Darmstadt, BRD
pH-Meter	pH526	WTW, Weilheim, BRD
Phospho-Imager	BAS Reader-2500	Raytest, BRD
Schüttelapparatur	Orbital-Shaker	Forma Scientific, Marietta, USA
Schwenktisch	Duomax 1030	Heidolph, Schwabach, BRD
Sequenziergerät	Li-cor Modell 4000	MWG-Biotec, Teddington, UK
Spektralphotometer	ND-1000 UV/VIS Spectronic Genesys 2 UV/VIS	NanoDrop Technologies, USA Milton Roy, Ivyland, USA
Sterile Werkbank	SterilGard	Baker Company, Sanford, USA
Streckbad	SB80	Microm, Walldorf, BRD
Temperaturschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, BRD
Trockenschrank	Typ T6060	Heraeus Instruments, Hanau, BRD
UV-Beleuchtungskammer	N90LW 366 nm	Konrad Bender, Wiesloch, BRD
Vakuumblotter	Model 785	BioRad, München, BRD
Wasserbad	Typ 1083	GFL, Burgwedel, BRD
Zellklammer	Cellclip für Cellspin II	Tharmac, Waldsolms, BRD
Zelltrichter	double Cellfunnel Cellspin	Tharmac, Waldsolms, BRD
Zentrifugen	Cellspin II Megafuge 1.0R Tischzentrifuge 5417R	Tharmac, Waldsolms, BRD Heraeus Instruments, Hanau, BRD Eppendorf, Hamburg, BRD

2.2. Verbrauchsmaterialien

Material	Name/Verwendung	Hersteller
Einbettmedium Fluoreszenz	Vectashild Mounting Medium	Vector Labs, Burlingame, USA
Einbettmedium Gefriermaterial	Tissue Tech O.C.T. Compound	Sakura Finetek, Torrance, USA
Einbettmedium HE-Färbung	Histofluid	Paul Marienfeld GmbH&Co.KG, BRD
Einbetttschälchen	Cryomold 15 x 15 x 5 mm	Sakura Finetek, Torrance, USA
Filterkarten	für Cytospins doppel Zelltrichter	Tharmac, Waldsolms, BRD
Filterpapier	Whatman 3 mm	Schleicher&Schuell, Dassel, BRD
Liquid wax	Überschichtung Sequenzierreaktionen	Biozym, Hess. Oldendorf, BRD
Labormaterialien	0,2; 0,5; 1 und 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, BRD
	15 und 50 ml Reaktionsröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, BRD
Matrigel	Invasionsassay	BD Falcon BD Biosciences, Bedford, USA
Nitrozellulosemembran	Hybond, Ø 82 mm, Koloniehybridisierung	GE Healthcare, Amersham, UK
PVDF-Membran	0,45 µm, Western Blot	Millipore, Bedford, USA
RNaseZap	RNasen Dekontaminierung	Ambion/ Applied Biosystems, Darmstadt, BRD
Röntgenfilme	Koloniehybridisierung	Kodak, Stuttgart, BRD
	Western Blot	Thermos Fisher Scientific, Wilmington, USA
Säulen	Mini Quick Spin Oligo Columns	Roche, Mannheim, BRD
Vollglasstäbe	Glaskapillaren Mikrodisektion	Schott AG, Jena, BRD
Wachsstift	DAKO Pen	Dako, Glostrup, Dänemark
Zellkulturmaterialien	6 und 10 cm Schalen 25 und 75 cm ² Flaschen 6, 12, 24-Loch-Platten 8 µm PET Inserts	BD Falcon BD Biosciences, Bedford, USA
	Pipetten 2, 5, 10, 20 ml Einfriertubes	Greiner Bio-One, Frickenhausen, BRD

2.3. Chemikalien, Lösungen, Medien

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid 30 % (w/v) 29:1 Acrylamid/Bisacrylamid	AppliChem, Darmstadt, BRD
Agarose für DNA-Gele Softagar (low melting)	Biozym, Hess. Oldendorf, BRD Lonza, Rockland, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt, BRD
Ampicillin (100 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Antibody Diluent	Dako, Glostrup, Dänemark
ß-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, BRD
Borsäure	Merck, Darmstadt, BRD
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen, BRD
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, BRD
Chloralhydrat	Roth, Karlsruhe, BRD
Denhardt's Solution (50 x)	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
Desoxynukleotid-Triphosphat Set	Roche, Mannheim, BRD

4', 6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, BRD
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt, BRD
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM)	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
Eosin, alkoholisch	Roth, Karlsruhe, BRD
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, BRD
Ethanol 99,6 % / 96 %	Baker, Deventer, Holland
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)	Merck, Darmstadt, BRD
Fibronektin (1 mg/ml)	Millipore, Schwalbach, BRD
Fixiermedium (Thinprep PreservCyt)	Cytic Coop., Marlborough, USA
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Gamma- ³² P]ATP	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, BRD
Gelatine	Serva, Heidelberg, BRD
Geneticin (G418)	PAA, Pasching, Austria
Glycerol 86 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Glycin	Merck, Darmstadt, BRD
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt, BRD
Harnstoff	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Hefe t-RNA (10 mg/ml)	Roche, Mannheim, BRD
Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat	Roth, Karlsruhe, BRD
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, BRD
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, BRD
Kaliumjodat	Roth, Karlsruhe, BRD
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt, BRD
Kanamycin (25 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Kollagen Typ I (1 mg/ml)	Millipore, Schwalbach, BRD
Kollagen Typ III (1 mg/ml)	Millipore, Schwalbach, BRD
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Laminin (1 mg/ml)	Millipore, Schwalbach, BRD
LB (lysogeny broth) Agarose	Roth, Karlsruhe, BRD
LB (lysogeny broth) Medium	Roth, Karlsruhe, BRD
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, BRD
Matrigel	BD Bioscience
Methanol	Baker, Deventer, Holland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, BRD
Natriumcitratdihydrat	Roth, Karlsruhe, BRD
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, BRD
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, BRD
Opti-MEM	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, BRD
PBS (Phosphat buffered saline)	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
Penicillin/Streptomycin	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
Puromycinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
RapidGEL XL-Solution 40 %	USB Cooperation, Cleveland, USA
RLT-Lysis-Puffer	Qiagen, Hilden, BRD

RNA Later	Qiagen, Hilden, BRD
ROX	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
Salzsäure 37 %	Roth, Karlsruhe, BRD
S.O.C. Medium	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt, BRD
Tris-Hydroxymethylaminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt, BRD
Triton X-100	Merck, Darmstadt, BRD
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Wasserstoffperoxid 30 %	Roth, Karlsruhe, BRD
Xylencyanol FF	Merck, Darmstadt, BRD
Xylol	Baker, Deventer, Holland
Ziegennormalserum	Dako, Glostrup, Dänemark
Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt, BRD

2.4. Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller
Anti-CAR H300	rabbit-anti-human	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
Anti-CAR Rmcb	mouse-anti-human	Millipore, Bedford, USA
Anti-Ki67	rabbit-anti-human	U.S. Biological, Swampscott, USA
Anti-p16 ^{INK4a} /MTS1	mouse-anti-human	MTM Laboratories
Anti-Zytokeratin AE1/3	mouse-anti-human	Dako, Glostrup, Dänemark
Anti-β-Aktin	mouse-anti-human	BD Bioscience Pharmingen, Bedford, USA
Anti-Kaninchen-HRP IgG	goat-anti-rabbit	Dianova, Hamburg, BRD
Anti-Maus-HRP IgG	goat-anti-mouse	Jackson ImmunoResearch Lab., Baltimore, USA
Anti-Kaninchen-Cy3 IgG	goat-anti-rabbit	Dianova, Hamburg, BRD
Anti-Maus-Cy2 IgG	goat-anti-mouse	Jackson ImmunoResearch Lab., Baltimore, USA

2.5. Enzyme und Kits

Kategorie	Bezeichnung	Hersteller
<u>Restriktionsenzyme:</u>	EcoRI (NEB Puffer 2 + 3)	New England Biolabs, Ipswich, USA
	XbaI (NEB Puffer 2)	New England Biolabs, Ipswich, USA
	BamHI (NEB Puffer 3)	New England Biolabs, Ipswich, USA
<u>DNA/RNA-Kits:</u>	QIAamp Blood Mini Kit (RNA-Isolation)	Qiagen, Hilden, BRD
	QIAprep Spin Mini Kit (Mini-Prep)	Qiagen, Hilden, BRD
	Nukleobond Xtra Midi Kit (Midi-Prep)	Macherey Nagel, Düren, BRD
	QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, BRD
<u>PCR/Enzyme:</u>	Polynukleotidkinase + 10 x Puffer	Roche, Mannheim, BRD
	SuperScript II + First-Strand-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
	RNase OUT	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
	SuperScript One-Step RT-PCR Mix (mit Platinum-Taq)	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
	AmpliTaq Gold + 10 x Gene Amp	Applied Biosystems, Darmstadt, BRD
	PCR SuperMix High Fidelity	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
	Platinum Quantitative PCR SuperMix (UDG)	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
	Power SYBR Green PCR MasterMix	Applied Biosystems, Darmstadt, BRD

	SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit-LC	Epicentre Biotechnologies, Madison, USA
<u>Sonstiges:</u>	MTT-Assay / Stop Solution	Promega, Mannheim, BRD
	DAKO EnVision™+ System, HRP	DAKO, Glostrup, Dänemark
	TOPO TA-Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe, BRD

2.6. Größenmarker

Bezeichnung	Hersteller
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth, BRD
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth, BRD
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth, BRD

2.7. Vektoren

Klon	Plasmid	Verwendung
2/7_3	pCR4_TOPO	Bestimmung der Primereffizienzen Etablierung der Spleißvarianten-spezifischen, quantitative RealTime-PCR
3/7-Dö3	pEF6-FLAG-His MCS	
4/7_6	pCR4_TOPO	
4/6_1	pCR4_TOPO	
6/7_6	pCR4_TOPO	
EGFP	pBK-CMV ΔNhel-Spel	Transfektion, Lokalisationsstudien, Funktionelle Assays (Zellvitalität, Proliferation, Migration, Invasion, Adhäsion), Western Blot, ICC
4/6_1 pBK2	pBK-CMV ΔNhel-Spel	
6/7_6 pBK2	pBK-CMV ΔNhel-Spel	
EGFP	pLXSP	Transfektion, Wachstum im Weichagar, ICC
HPV 16 E7 7.1	pLXSP	
4/6_1CAR4/6	pLXSP	
6/7_6CAR5/4	pLXSP	

2.8. Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Referenz
HaCaT	Humanes Melanom (Peripherie)	Boukamp et al. 1988 [181]
HeLa	Humanes Zervixkarzinom	Gey et al. 1952 [182]
HT1080	Humanes Fibrosarkom	Rasheed et al. 1974 [183]
MDA_MB435S	Humanes Melanom	Ellison et al. 2002 [184]
NIH3T3	Murine Embryofibroblasten	Todaro et al. 1963 [185]
SW756	Humanes Zervixkarzinom	Freedman et al. 1982 [186]

2.9. Gewebe

Das verwendete Biopsiematerial wurde den Patientinnen zu diagnostischen Zwecken (Verdacht auf CIN nach Kolposkopie) oder im Rahmen der operativen Entfernung eines Zervixkarzinoms entnommen. Alle Patientinnen stimmten der Verwendung des entnommenen Gewebes zur Bestimmung experimenteller Biomarker zu.

3. Methoden

3.1. Arbeiten mit prokaryotischen Zellen

3.1.1. Herstellung kompetenter Zellen

Kompetenz bezeichnet die Fähigkeit von Zellen, freie DNA aus dem umliegenden Medium aufzunehmen. Diese Eigenschaft kann chemisch forciert und für die Transformation von Genen zu Hilfe genommen werden. Als Grundlage hierfür dienten *Escherichia coli*-Zellen (*E. coli*) von Stamm Top10. Zur Herstellung einer Vorkultur wurden 5 ml LB-Medium mit Zellen einer Glyzerinkultur angeimpft und über Nacht unter schütteln bei 37 °C inkubiert.

LB-Medium	0,5 % w/v Hefeextrakt
	1 % w/v Trypton
	0,05 – 1 % w/v Natriumchlorid
	pH 7,0

Am nächsten Tag erfolgte die Überführung von 200 µl Vorkultur in 200 ml vorgewärmtes LB-Medium. Die Hauptkultur wurde nun bis zum Erreichen einer Optischen Dichte (OD_{550nm}) von 0,3 bei 37 °C geschwenkt. Der folgende Zentrifugationsschritt für 10 min bei 4 °C und 3000 U/min pelletierte die Zellen, so dass diese im Anschluss in 100 ml eiskaltem 100 mM $MgCl_2$ / 5 mM Tris pH 7,4 auf Eis resuspendiert werden konnten. Darauf folgte ein weiterer äquivalenter Zentrifugationsschritt und die erneute Resuspension des Zellpellets in 100 ml 100 mM $CaCl_2$ / 5 mM Tris pH 7,4 auf Eis. Nach einer 20- bis 60-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen ein weiteres Mal für 10 min bei 4 °C und 3000 U/min zentrifugiert und in 2 ml 100 mM $CaCl_2$ / 5 mM Tris pH 7,4 / 14 % Glyzerin aufgenommen. Diese Suspension chemisch kompetenter Zellen konnte nun abschließend in Aliquots von 100 µl in bei - 80 °C vorgekühlte Reaktionsgefäße abgefüllt und bei - 80 °C gelagert werden.

3.1.2. Kultivierung

Alle Experimente erfolgten auf der Basis von LB-Medium bei 37 °C. Bei Bedarf wurde je nach exprimiertem Resistenzgen eine Selektion mittels Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µl/ml) durchgeführt.

3.1.2.1. Kultivierung auf Agarose-Nährböden

Für die Generierung klonaler Einzelkolonien und deren Quantifizierung war es erforderlich, die Mikroorganismen zu immobilisieren. Als Basis hierfür dienten sterile Petrischalen mit einer 2 %-igen LB-Agarose Schicht. Ausgehend von einer Zellsuspension wurden zwischen 20 µL und 100 µl Flüssigkeit auf eine vorgewärmte Platte ausgebracht und mit einem

abgeflamten Drigalskispatel sorgfältig verteilt. Nach Übernachtinkubation erfolgten die Begutachtung der Platten sowie die Weiterverarbeitung der Bakterienklone.

3.1.2.2. Flüssigkulturen

Zur Herstellung von Flüssigkulturen wurden Mikroorganismen in flüssigem LB-Nährmedium inkubiert. Gleichmäßiges Schwenken und nur locker verschlossene Kultivierungsgefäße sorgten hierbei für gute Belüftung und optimales Wachstum. Je nach Experiment und zu erzielender Ausbeute wurde im Vorkultur- (5 ml Medium, angeimpft mit einer Kolonie) oder Hauptkulturmaßstab (100 ml Medium, angeimpft mit 100 µl Vorkultur) gearbeitet.

3.1.2.3. Glyzerinkulturen

Bestand die Notwendigkeit, einzelne Zellklone für spätere Arbeiten zu konservieren, wurde eine Glyzerinkultur aus 600 µl Zellsuspension und 400 µl 50 %-igem Glyzerin angelegt und bei - 80 °C gelagert. Aus dieser konnte durch die Entnahme eines kleinen Teils der gefrorenen Zellsuspension mittels eines Zahnstochers bei Bedarf eine neue Vorkultur angeimpft werden.

3.1.3. Transformation

Die Überführung von Plasmidkonstrukten in eine Empfängerzelle (Transformation) stellt eine kostengünstige und präzise Methode dar, DNA mit hoher Ausbeute zu amplifizieren. Hierfür wurde pro Transformation ein Aliquot kompetenter *E. coli* (Stamm: TOP10) langsam auf Eis aufgetaut, mit Plasmid-DNA bzw. 2 µl Ligationsansatz versetzt, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein 30-sekündiger Hitzeschock bei 42 °C gefolgt von einem sofortigen Abkühlen der Zellsuspension auf Eis. Jede Reaktion wurde nun mit 250 µl vorgewärmten S.O.C.-Medium versetzt und zur Expression des Antibiotika Resistenzgens für eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln vorinkubiert. Die parallel vorgewärmten Selektionsplatten dienten abschließend als Nährboden für 50 µl bis 100 µl ausplattierter transformierter Zellen.

3.1.4. Koloniehybridisierung

Lag nach Kultivierung eines ausplattierten Transformationsansatzes eine sehr große Zahl ausgewachsener Kolonien vor, konnte mittels Koloniehybridisierung eine Vorselektion infrage kommender Klone erzielt werden (Abbildung 3.1).

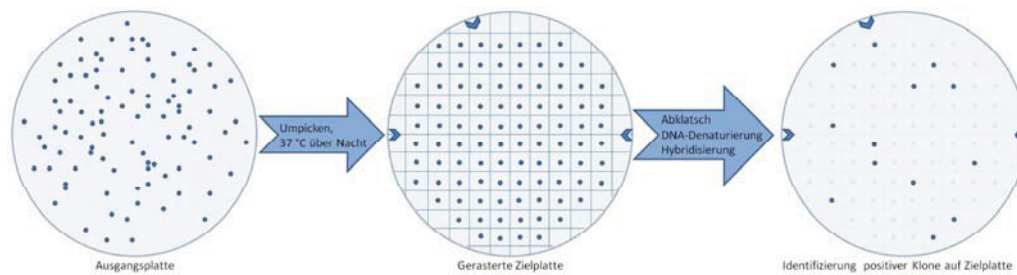


Abbildung 3.1 Ablauf einer Koloniehybridisierung. Nach Umpicken und Kultivierung transformierter Zellen auf eine Rasterplatte, wurden diese durch Abklatsch auf eine Nitrozellulosemembran überführt, die enthaltene DNA nach Denaturierung auf der Membran immobilisiert und mittels markierter Oligonukleotid-Sonde nach Zielsequenzen gesucht. Der anschließende Abgleich positiver Signale mit der Rasterplatte ermöglicht die Identifizierung erfolgreich transformierter Zellklone.

Hierzu erfolgte das Umpicken einzelner Kolonien auf eine gerasterte Zielplatte und deren Übernachtinkubation bei 37 °C. Nach Auswachsen neuer Kolonien wurden diese durch Abklatsch auf eine Nitrozellulosemembran überführt und zu Zellyse und DNA-Denaturierung jeweils 5 min mit folgenden Lösungen getränkt:

Lösung I	0,5 N NaOH / 1,5 N NaCl
Lösung II	1 M Tris/HCl pH 8,0
Lösung III	1 M Tris/HCl pH 7,5 / 2 x SSC
Lösung IV	2 x SSC
20 x SSC	3 M Natriumchlorid 0,3 M Natriumzitat

3.1.4.1. Vorhybridisierung

Dem anschließenden UV-induzierten Immobilisieren der DNA auf der Membran folgte deren Inkubation mit Vorhybridisierungslösung (VHL) für mindestens 3 h bei 42 °C in einem Hybridisierungsofen. Je nach Größe der Membran wurden 5 ml bzw. 10 ml Lösung eingesetzt.

VHL	6 x SSC 5 x Denhardt`s Solution 0,02 M Natriumpyrophosphat (NaPP) 0,5 % SDS 100 µg/ml Hefe t-RNA H ₂ O auf 5 bzw. 10 ml
1 M NaPP	57,7 ml 1M Na ₂ HPO ₄ 42,3 ml 1M NaH ₂ PO ₄

Da es sich bei der eingesetzten Sonde um ein markiertes Oligonukleotid mit hoher Spezifität bei moderater Hybridisierungstemperatur handelte, konnte auf den Formamidanteil in den

Lösungen verzichtet werden. Die Vorhybridisierung diente der Blockade freier Bindungsstellen auf der Membran und reduzierte so unspezifische Bindungen im Rahmen der später folgenden Sondeninkubation.

3.1.4.2. Sondenherstellung

Die Basis der Sonde bildete ein DNA-Oligonukleotid (z.B. Primer), welches komplementär an die nachzuweisende Zielsequenz binden kann. An dessen 5'-OH Terminus wurde mittels katalytischer Phosphorylierung durch eine Polynukleotidkinase radioaktiv markiertes $\gamma^{32[P]}$ -ATP angehängt. Hierzu erfolgte eine 30-minütige Inkubation folgender Reagenzien bei 72 °C.

3 μ l DNA Oligonukleotid (10 pmol/ μ l)
 5 μ l $\gamma^{32[P]}$ -ATP (10 μ Ci/ μ l)
 2 μ l 10 x Phosphorylierungspuffer
 1 μ l Polynukleotidkinase (10 U/ μ l)
 H₂O auf 20 μ l

Das verbleibende ungebundene $\gamma^{32[P]}$ ATP wurde unter Zuhilfenahme von Mini Quick Spin Oligo Columns abgetrennt und der Einbau von Radioaktivität in die Sonde mittels eines Counters bestimmt.

3.1.4.3. Hybridisierung

Nach erfolgreicher Blockierung aller freien Bindungsstellen wurde der Gesamtansatz oben markierter Sonde in 5 bzw. 10 ml Hybridisierungslösung (HL) verdünnt und unter gleichmäßiger Rotation für 48 h bei 55 °C ($T_{M(Oligo)}$ abzüglich 5 - 10 °C) über die Membran gespült.

HL 6 x SSC
 1 x Denhardt's Solution
 0,02 M NaPP
 100 μ g/ml Hefe t-RNA
 ^{32}P Oligonukleotid
 H₂O auf 5 bzw. 10 ml

Im Anschluss erfolgte sukzessives Waschen bei zwei mal 37 °C, ein mal 50 °C und ein mal 55 °C in 6 x SSC/0,02 M NaPP für jeweils 30 min. Einer 20- bis 30-minütigen Kurzexposition auf Biolmager-Platten zur ersten Sondierung der Signalintensitäten folgte eine längere Exposition auf Röntgenfilmen. Nach Abgleich des fixierten Films mit der gerasterten Zielplatte war die Identifizierung und Weiterkultivierung erfolgreich transformierter Klone möglich.

3.2. Arbeiten mit adhärent wachsenden eukaryotischen Zelllinien

3.2.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

3.2.1.1. Auftauen

Die dauerhafte Lagerung eukaryotischer Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Nach Entnahme einzelner Kryoröhrchen wurde die darin enthaltene Zellsuspension mittels Körperwärme der Hand leicht angetaut und anschließend unter Zugabe von 1 ml vorgewärmtem Medium und ständigem auf- und abpipettieren zügig resuspendiert. Eine weitere Verdünnung der Zellsuspension mit Medium und ein anschließender Zentrifugationsschritt für 4 min bei 1100 rpm dienten der Entfernung toxischer Reste des Einfriermediums. Das daraus resultierende Zellpellet konnte nun in entsprechenden Mengen Medium resuspendiert und in passenden Gefäßen kultiviert werden.

3.2.1.2. Splitten

Sobald die Zellen eine Konfluenz von 90 - 100 % erreicht hatten, erfolgte das Splitten der Kultur. Hierzu wurde das überstehende Medium entfernt, die Zellen kurz mit Trypsin/EDTA-Lösung gespült und erneut mit dieser Lösung bedeckt.

Trypsin/EDTA	1 x PBS
	0,05 % Trypsin
	2 mM EDTA pH 8,0
	steril filtriert

Nach einer 5- bis 10-minütigen Inkubation bei 37 °C und mikroskopischer Kontrolle der Vollständigkeit des Ablöseprozesses wurde die Zellsuspension nun mit Medium verdünnt und in Verhältnissen von 1:2 bis 1:16 aufgeteilt. Im Gefäß verbleibende Zellen konnten nach Zugabe von frischem Medium weiter kultiviert werden, abgeteilte Zellpopulationen bildeten die Grundlage von *in vitro*-Experimenten.

3.2.1.3. Einfrieren

Das Einfrieren von Zellen in speziellem Einfriermedium diene deren Konservierung. Hierzu wurde eine beim Splitten abgeteilte Zellpopulation für 4 min bei 1100 rpm zentrifugiert, das daraus resultierende Zellpellet in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und die Suspension in spezielle Kryoröhrchen überführt. Im Anschluss erfolgte langsames herunter kühlen in einer Einfrierbox für 1 bis 2 Tage bei - 80 °C und Lagerung in flüssigem Stickstoff.

Einfriermedium	60 % D-MEM
	30 % FCS
	10 % DMSO

3.2.2. Transfektion mit Lipofectamin 2000

Die Transfektion diente dem Einbringen externer DNA in eukaryotische Zellen mittels Plasmidvektoren. Diese Konstrukte tragen neben dem einzubringenden Gen auch ein Resistenzgen für eine spätere Antibiotikaselektion erfolgreich transfizierter Zellen. Es wurden verschiedene Zelllinien so in eine 6-Well-Platte ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 90 - 95 % erreicht hatten. Anschließend wurden pro Well 4 µg Plasmid-DNA und 10 µl Lipofectamin 2000 mit je 250 µl Opti-MEM-Medium versetzt, nach 5-minütiger Präinkubation gemischt, erneut 20 min inkubiert und auf die Zielzellen getropft. Nach 3-stündiger Einwirkzeit erfolgte ein Mediumwechsel. Kontrolltransfektionen mit EGFP ermöglichten eine spätere Aussage über die Transfektionseffizienz.

3.2.3. Selektion

Eine anschließende Selektion mit Geneticin (G418) resultierte in der Generierung von Kulturen mit linearisiert in ihr eigenes Genom eingebauten Plasmidkonstrukten. Die Weitergabe der eingebrachten DNA an Tochtergenerationen gestattete es, diese stabil transfizierten Kulturen auch langfristig für funktionelle Assays einzusetzen. Unter bestehendem Selektionsdruck ist ein Verlust der eingebrachten Gene nicht zu erwarten.

3.2.4. DAPI-Färbung

Zur besseren Visualisierung der Kernmorphologie adhärenter Kulturen erfolgte deren Kernfärbung mit dem in AT-reiche Regionen der kleinen Furche doppelsträngiger DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff 4', 6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI). Auf Deckgläschen kultivierte Zellen wurden mit Methanol/Essigsäure im Verhältnis drei zu eins für 30 - 40 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend getrocknet. Nach Auftropfen von, mit DAPI versetztem, Einbettmedium (0,4 µg/ml Endkonzentration) und kopfüber Positionierung auf einem Objektträger erfolgte die mikroskopische Auswertung der Kerne.

3.2.5. Herstellung von Zytospins

Für die Herstellung von Zytospins wurde ein Objektträger von speziellen Filterkarten abgedeckt, in eine dafür vorgesehene Zellklammer gelegt und mit einem befüllbaren Zelltrichter verschlossen. In beide Vertiefungen des Trichters wurden je 10⁵ Zellen in 100 µl (oberer Spot) bzw. 150 µl (unterer Spot) PBS eingefüllt und der komplette Komplex für 2 min bei 500 rpm in einer Zytocentrifuge zentrifugiert. Nach Trocknen der Spots konnten die Zellen entweder direkt immunzytochemisch markiert oder luftdicht verpackt bei - 80 °C gelagert werden.

3.2.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

3.2.6.1. Gelherstellung

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) unter Verwendung von SDS dient der Auftrennung eines komplexen Proteingemisches nach unterschiedlichen Größen. Je nach Konzentration der Acrylamid-Methylenbisacrylamid-Monomere lassen sich bevorzugt Proteine mit niedrigem (hochprozentiges Gel) oder mit hohem (niedrigprozentiges Gel) Molekulargewicht nachweisen. Ein Überblick über die Komponenten unterschiedlich prozentiger kleinformatiger Trenngele findet sich in Tabelle 3-1. Sind größere Gelformate erforderlich müssen die Volumina entsprechend angepasst werden. Zur Gewährleistung einer glatten Kante wurden gegossene Trenngele vor der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet.

Tabelle 3-1 Zusammensetzung unterschiedlich prozentiger Acrylamid-Trenngele

	8 %	10 %	12 %	15 %	17 %
Acrylamid-Mix	1,3 ml	1,7 ml	2,0 ml	2,5 ml	2,8 ml
4 x Tris-HCl/SDS pH 8,8	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml
H₂O	2,4 ml	2,0 ml	1,7 ml	1,2 ml	0,9 ml
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

4 x Tris-HCl/SDS pH 8,8 1,5 mM Tris (mit HCl auf pH 8,8 eingestellt)
 13,8 mM SDS (= 4 g/l)

Nach erfolgreicher Aushärtung des Trenngels wurde überstehende Flüssigkeit entfernt und ein kleines, niedrigprozentiges Sammelgel nach folgendem Schema hergestellt (Tabelle 3-2). Sind größere Gelformate erforderlich, müssen die Volumina auch hier entsprechend angepasst werden. Dem Gießen des Gels folgte sofortiges luftblasenfreies Positionieren des Gelkammes bis zur vollständigen Polymerisation.

Tabelle 3-2 Zusammensetzung eines kleinen niedrigprozentigen Acrylamid-Sammelgels

Acrylamid-Mix	260 µl
4 x Tris-HCl/SDS pH 8,8	500 µl
H₂O	1,22 ml
10 % APS	20 µl
TEMED	2 µl

4 x Tris-HCl/SDS pH 6,8 0,5 mM Tris (mit HCl auf pH 6,8 eingestellt)
 13,8 mM SDS (= 4 g/l)

3.2.6.2. Probenvorbereitung

Stabil transfizierte Kulturen wurden trypsiniert, gezählt und unter regelmäßigem schütteln für 30 min auf Eis lysiert.

Lysepuffer	50 mM Tris
	150 mM NaCl
	1 mM MgCl ₂
	1 % Triton X 100

Durch 15-minütige Zentrifugation des Zellaufschlusses bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit erfolgte die Abtrennung der verbliebenen Zelltrümmer vom proteinhaltigen Überstand. Zur Denaturierung der enthaltenen Proteine wurde die einer definierten Zellzahl entsprechende Menge Zelllysate mit 6 x SDS-Puffer für 10 min bei 99 °C aufgekocht und anschließend auf Eis abgekühlt.

6 x SDS Probenpuffer	7 ml 4 x Tris-HCl/SDS pH 6,8
	3 ml Glycerin
	347 mM SDS
	602 mM DTT
	1,2 mg Bromphenolblau

3.2.6.3. Gellauf

Nach Polymerisation des Gels erfolgte dessen Überführung in eine mit SDS-Laufpuffer gefüllte Gelkammer. Nicht polymerisierte Acrylamidreste wurden nach Herauslösen des Gelkammes mittels spülen entfernt und Proben sowie Größenmarker aufgetragen. Aufgrund zu erzielender Auftrennung geringer Größenunterschiede erfolgte der Gellauf bei niedriger Stromstärke (ca. 15 mA/Gel) für längere Zeit (5 h).

SDS-Laufpuffer	25 mM Tris
	200 mM Glycin
	3,5 mM SDS

3.2.7. Western Blot

3.2.7.1. Blot

Um die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran zu überführen erfolgte ein SemiDry-Blot. Sowohl Gel als auch mit Methanol befeuchtete Membran und zugeschnittenes Filterpapier wurden für etwa 15 min in Transferpuffer äquilibriert und im Anschluss in definierter Reihenfolge zusammen gesetzt (Abbildung 3.2).

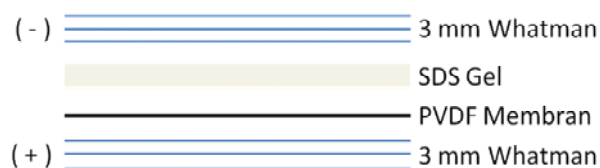


Abbildung 3.2 Blotaufbau zur Durchführung eines Western Blots. Begrenzt durch jeweils drei 3mm-Whatman-Filterpapiere erfolgt mittels Stromfluss die Übertragung der negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran ($I = 1 \text{ mA/cm}^2$).

Die Blotbedingungen lagen bei $I = 1 \text{ mA/cm}^2$ für eine Laufzeit von 1 h.

Transferpuffer	25 mM Tris
	200 mM Glycin
	20 % w/v Methanol

3.2.7.2. Immunreaktion

Zur späteren Vermeidung unspezifischen Hintergrunds erfolgte im Anschluss die Blockierung auf der Membran verbliebener freier Proteinbindungsstellen mittels einer 0,04 % Gelatinelösung (Net-G). Diese wirkte unter schwenken über Nacht bei 4 °C auf die Membran ein. Selbige wurde zur Verdünnung aller verwendeten Antikörper eingesetzt.

Net-G	0,05 M Tris
	0,15 M NaCl
	0,005 M EDTA
	0,05 % Tween 20
	0,04 % Gelatine (in H ₂ O gelöst)
	mit HCl auf pH 7,5 eingestellt

Am folgenden Tag erfolgte im ersten Schritt der Nachweis der CAR Expression mittels Anti-CAR H300 (1:1000) Antikörper. Nach 2-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur und 6-maligem Waschen für jeweils 5 min mit TBS-Tween wurde der Meerrettichperoxidase (*horse reddish peroxidase*, HRP) gekoppelte Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen, 1:10.000) für 1 h auf die Membran gegeben. Daran anschließend erfolgte erneutes Waschen sowie die Detektion gebundener HRP mittels Chemilumineszenz und Röntgenfilmen.

TBS-Tween	24,8 mM Tris
	137 mM NaCl
	2,68 mM KCl
	0,1 % Tween 20
	mit HCl auf pH 7,5 eingestellt

Der parallele Nachweis von β -Aktin als Ladekontrolle auf derselben Membran erforderte das Ablösen bereits gebundener Signalgeber. Hierfür verwendeter Strip-Puffer wurde auf 50 °C erhitzt, für 30 min über die Membran gespült und Pufferreste gründlich mit TBS-Tween entfernt.

Strip-Puffer	62,5 mM Tris
	2 % SDS
	100 mM β -Mercaptoethanol (frisch zugeben)

Im Anschluss erfolgte eine neue Kurzblockierung mit Net-G (1h 37 °C), die Inkubation mit anti- β -Aktin (1:2000) für 1 h sowie HRP-gekoppeltem anti-Maus-Sekundärantikörper

(1:10.000) ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur. Zwischenzeitliches Waschen sowie Detektion erfolgten äquivalent zum CAR Nachweis.

3.2.8. MTT-basierter Proliferationsassay

Stabil transfizierte Zellen wurden trypsinisiert, gezählt und je 1×10^5 Zellen pro Well in eine 12-Well-Platte ausgesät. Nach 1 h, 24 h und 48 h erfolgte die Visualisierung stoffwechselaktiver lebender Zellen mittels Reduktion eines wasserlöslichen gelben Tetrazoliumsalses zu einem wasserunlöslichen violetten Formazan (Abbildung 3.3).

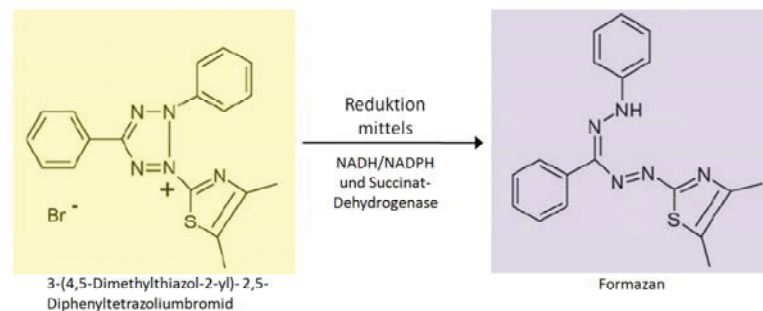


Abbildung 3.3 MTT-Assay zur Bestimmung der metabolischen Aktivität einer Kultur. Die Reduktion des gelben Tetrazolsalzes zu violetter Formazan erfolgt durch NADH/NADPH und Succinat-Dehydrogenase. In Anlehnung daran ermöglicht dieser Test Rückschlüsse auf die Anzahl stoffwechselaktiver Zellen und damit auch auf die Proliferation der Zellen (nach [187]).

Nach Mediumwechsel (nur für) und Zugabe des Farbstoffes inkubierten die Zellen für 1 h bei 37 °C. Der Substratumsatz wurde im Anschluss durch Zugabe einer Solubilisierungslösung gestoppt, die Proben für mindestens 1 h und maximal 24 h bei 4 °C gelagert und abschließend die Optische Dichte (OD) bei 570 nm bestimmt. Die 24 h- und 48 h-Werte wurden auf die metabolische Aktivität 1 h nach Aussaat der Zellen abgeglichen.

3.2.9. Migrations- und Invasionsassay

Zur Bestimmung der Mobilität und Invasivität transfizierter Zellen erfolgte der Einsatz von, in 24-Well-Platten eingehängten, PET-Membran-Zellkulturinserts mit 8,0 µm großen Poren. Einziger Unterschied zwischen beiden Tests bestand in der Beschichtung der Membran. Während Migration über unbeschichtete Inserts ablief erforderte der Invasionsassay eine Vorbeschichtung der Inserts mit einer Basalmembranmatrix (Matrigel). Hierfür erfolgte eine 1:4 Verdünnung von Matrigel mit eiskaltem PBS, Beschichtung der Inserts mit je 20 µl Matrix und Polymerisation dieser für mindestens 1 h bei 37 °C. Anschließende Schritte liefen beschichtungsunabhängig für beide Assays homolog ab. Nach Befüllen der unteren Kammer des Transwell-Komplexes mit 500 µl Kulturmedium mit 10 % FCS wurden je 10^5 Zellen in 500 µl 0,1 % FCS-haltigem Medium aufgenommen, in der oberen Kammer ausgesät und für 7 h (HT1080) beziehungsweise 24 h (HeLa, SW756; MDA_MB435S) bei 37 °C kultiviert

(Abbildung 3.4). Darauf folgte ein Fixierschritt in eiskaltem 80 % Ethanol sowie die Entfernung verbliebener Zellen und Matrigelreste von der Oberseite der Membran mit Hilfe eines Wattestäbchens. Alle Inserts wurden im Anschluss für 5 min mit 0,1 % Kristallviolett gefärbt, mit 10 % Essigsäure entfärbt und die OD dieser Lösung bei 630 nm vermessen (nach [188]).

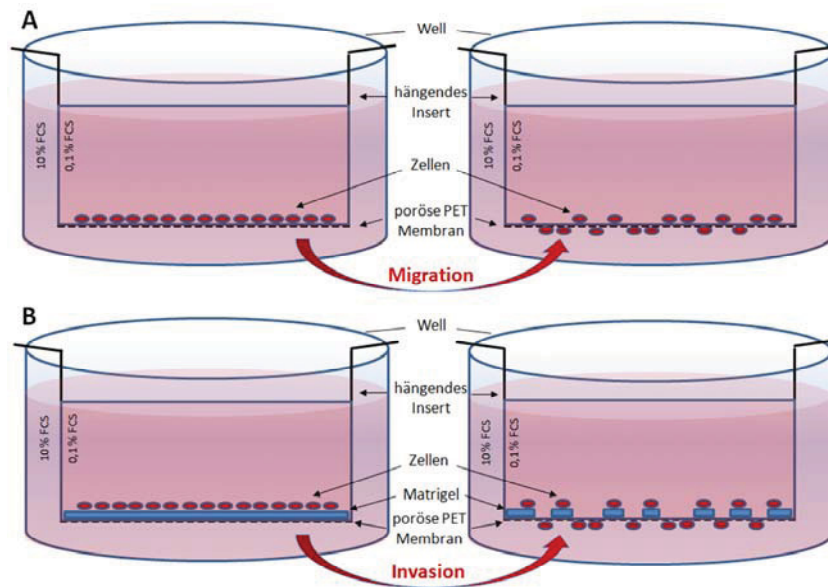


Abbildung 3.4 Transwellassays zur Bestimmung von Migrations- und Invasionsverhalten verschiedener Zellen. Ein Konzentrationsgradient von 0,1 % zu 10 % FCS im Medium diente als Chemoattraktant. A: Bei Einsatz unbeschichteter Inserts wird das migratorische Potenzial der Zellen bestimmt. B: Die Messung der Invasivität basiert auf der Fähigkeit, Matrigel aktiv abzubauen zu können. Nur dann gelangen Zellen an die Unterseite der Membran.

3.2.10. Adhäsion

Basis der Adhäsionsexperimente bildete die Beschichtung von Zellkulturplatten mit Komponenten der Extrazellulären Matrix (extracellular matrix, ECM) oder BSA als Kontrolle. Alle Arbeiten erfolgten mit je 2×10^4 Zellen im 96-Well-Format oder 1×10^5 Zellen im 12-Well-Format. Unbeschichtete Platten wurden mit den ECM Komponenten Kollagen Typ I, Kollagen Typ III, Fibronektin und Laminin (10 µg/ml) für 16 h bei 4 °C inkubiert. Daran anschließend erfolgte die Beschichtung verbliebener freie Bindungsstellen sowie Kontroll-Well's für 2 h mit 2 % BSA in PBS. Nach Aussaat definierter Zellzahlen und 2-stündiger Inkubation wurden Überstand und nichtadhärente Zellen entfernt, alle Wells zweimalig mit PBS gespült und adhäre Zellen mit 0,1 % Kristallviolett für 5 min gefärbt. Entfärbung der Zellen mit 10 % Essigsäure ermöglichte die Bestimmung der Optischen Dichte des Überstands bei 630 nm. Normalisierung der Werte auf unspezifische Adhäsion an BSA diente dem Ausschluss von Schwankungen in der eingesetzten Zellzahl.

3.2.11. Ankerungsunabhängiges Wachstum in Weichagar

Grundlage des hier beschriebenen Tests bildeten mit pLXSP-Konstrukten transient und stabil transfizierte immortalisierte Mausfibroblasten (NIH3T3). Nach Herstellung und Aushärtung einer Agarosebasisschicht aus 0,5 % Softagar in D-MEM mit 1 µg/ml Puromycin erfolgte die Resuspendierung einer definierten Zellzahl in 0,3 % Softagar (D-MEM, 1 µg/ml Puromycin) sowie die Aussaat von 8×10^4 Zellen pro Well einer 6-Well-Platte. Einer 14-tägigen Kultivierung unter regelmäßiger Nährstoffzugabe folgte die Auszählung ausgewachsener Kolonien mit einer Mindestgröße von 0,4 mm.

3.3. Arbeiten mit humanem Biopsiematerial

3.3.1. Aufarbeitung von Gefriergewebe

Direkt nach Entnahme der Gewebeproben erfolgte deren Überführung in Kryoröhrchen, Tieffrieren in flüssigem Stickstoff und Lagerung bei - 80 °C. Im Zuge der Einbettung wurde das gefrorene Gewebe von Hand auf die gewünschte Größe zugeschnitten und in ein mit O.C.T. Compound gefülltes Cryomold gedrückt. Nach vorsichtigem Tieffrieren in flüssigem Stickstoff konnten je nach Zielstellung Kryoschnitte unterschiedlicher Dicke angefertigt werden.

3.3.2. Aufarbeitung von formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe

Aus gekühlten Paraffinblöcken mit formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe (*formalin fixed paraffin embedded tissue*, FFPET) wurden unter Verwendung eines Mikrotoms 4 µm dicke Schnitte angefertigt, mit Hilfe eines Wasserbades auf Objektträger aufgezogen und darin enthaltene, kleinere Falten in einem auf 50 °C erwärmten Streckbad entfernt. Um bessere Haftung des Gewebes auf der Glasoberfläche zu erreichen, erfolgte nach Trocknung der Schnitte bei Raumtemperatur eine 45-minütige Erhitzung der Objektträger auf 54 °C. Alternativ zur direkten Verwendung waren die Schnitte bei Raumtemperatur lagerfähig.

3.3.3. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Diese Färbemethode dient der Visualisierung von Struktur und Gewebemorphologie eines Schnittes. Während Hämatoxylin eher basophile Strukturen wie Zellkerne oder raues Endoplasmatisches Retikulum färbt, markiert Eosin bevorzugt azidophile Zellplasmaproteine. FFPET musste zu Beginn in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Ethanolreihe rehydriert werden. Schnitte aus Gefriergewebe wurden in 96 % Ethanol fixiert und ebenfalls rehydriert. Nach einer Spülung in destilliertem Wasser erfolgte die 2-minütige Hämatoxylinfärbung mit anschließendem bläuen des Gewebes unter Leitungswasser. Darauf folgend wurde erneut mit destilliertem Wasser gespült, 2 min in alkoholischem Eosin gefärbt

und die Färbung in 70 % Ethanol differenziert. Eine aufsteigende Ethanolreihe und die Überführung in Xylol dienten daran angeschlossen der Entwässerung und Entsprittung des Gewebes. Einbettung in Histofluid gewährleistete die Haltbarkeit der Präparate.

Hämatoxylin	1,5 mM Hämatoxylin in 5 ml absolutem Ethanol lösen (auf 500 ml mit H ₂ O auffüllen)
	0,47 mM Kaliumiodat
	52,7 mM Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat (komplett lösen lassen)
	151 mM Chloralhydrat
	2,6 mM Zitronensäure
	filtriert etwa 2 Monate haltbar

3.3.4. Immunhistochemie (IHC)

Diese Methode ermöglicht die spezifische Darstellung von Proteinexpression im Gewebe. Äquivalent zur HE-Färbung musste das FFPET zu Beginn in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Ethanolreihe rehydriert werden. Im Anschluss erfolgte ein 15-minütiger Andau mit 0,1 % Trypsin in 37 °C warmem PBS und ein ebenfalls 15-minütiger Demaskierungsschritt bei 99 °C in Zitratpuffer.

PBS	137 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat 1,4 mM Kaliumdihydrogenphosphat
Zitratpuffer	18 ml Lösung A (10 mM Zitronensäuremonohydrat) 82 ml Lösung B (10 mM Natriumzitratdihydrat)

Nach dem Abkühlen des Puffers auf Raumtemperatur und Begrenzung der Inkubationsfläche durch einen hydrophoben Ring (DAKO Pen) folgte die Blockierung der endogenen Peroxidase mittels einer 3 %-igen Wasserstoffperoxidlösung in IHC-Waschpuffer.

IHC-Waschpuffer	0,05 M Tris/HCl pH 7,6 0,15 M Natriumchlorid 0,1 % Tween 20
-----------------	---

Schnitte aus Gefriergewebe sowie Cytospins wurden zu Beginn mit dem DAKO Pen markiert und für 10 min in einer Lösung aus 4 % Paraformaldehyd (PFA) in IHC-Waschpuffer fixiert. Darauf folgend wurde nach kurzem Spülen mit Waschpuffer die endogene Peroxidase des Gewebes mit einer 0,6 %-igen Wasserstoffperoxidlösung blockiert. Die anschließende Weiterbehandlung war für alle Gewebe identisch. Alle Inkubationsschritte erfolgten in einer feuchten Kammer. Nach einer 1-stündigen Blockierung mit 1:5 verdünntem Ziegennormalserum wurden die in Antibody Diluent entsprechend verdünnten Antikörper für

eine Übernachtinkubation bei 4 °C auf die Schnitte gegeben. Ein Überblick über die verwendeten Primärantikörper ist in Tabelle 3-3 dargestellt.

Tabelle 3-3 Für Immunhistochemische Analysen verwendete Primärantikörper mit entsprechender Verdünnung.

Bezeichnung	Spezies	Antigen-Spezifität	Verdünnung
Anti-CAR H300	rabbit-anti-human	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor CXADR	1:250
Anti-CAR RmcB	mouse-anti-human	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor CXADR	1:500
Anti-Ki67	rabbit-anti-human	Ki67	1:50
Anti-p16 ^{INK4a} /MTS1 MTM-E6H4	mouse-anti-human	Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor 2A CDKN2A	1:200
Anti-Zytokeratin AE1/AE3	mouse-anti-human	basische und saure Zytokeratine	1:500

Am folgenden Tag wurde nach etwa 30-minütigem Waschen ein Konjugat aus Sekundärantikörper und einem HRP-markierten Polymer auf die Schnitte getropft (DAKO EnVision™+ System, HRP) und wiederum für 30 min inkubiert. An den folgenden 30-minütigen Waschschrift schloss sich die Detektion mit einem hoch sensitiven Diaminobenzidin(DAB+)-Chromogen-Substrat-System und die Gegenfärbung mit Hämatoxylin an. Für bessere Handhabbarkeit wurden die Schnitte in Gelatine eingedeckt und bei Raumtemperatur getrocknet.

3.3.5. Immunfluoreszenz

In Anlehnung an das IHC-Protokoll wurden ebenfalls Fluoreszenzmarkierungen durchgeführt. Nach Fixierung mit 4 % PFA und 60-minütigem Block der freien Bindungsstellen mit Ziegennormalserum erfolgte die Parallelinkubation von polyklonalem anti-CAR Antikörper H300 und monoklonalem Anti-CAR Antikörper RmcB für 3 - 4 h bei 4 °C und unter Lichtausschluss. Nach diversen Waschschriften konnten spezifisch gebundene Antikörper mittels Anti-Kaninchen-Cy3 (1:500) und Anti-Maus-Cy2 (1:250) konjugierter Sekundärantikörper direkt detektiert werden. Eine Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (0,4 µg/ml Einbettmedium). Die hochauflösende Darstellung der Zellen gelang durch Einsatz konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie und unter Verwendung der LSM510 Image-Examiner-Software (Zeiss, Jena, Germany).

3.3.6. Mikrodissektion

Der Einsatz manueller Mikrodissektion erlaubt es, spezifische Areale eines Gewebeschnittes gezielt zu isolieren. Hierfür wurde ein spezielles Phasenkontrastmikroskop mit Mikromanipulator verwendet. Unter Zuhilfenahme eines Heizelements und magnetischer

Zugkräfte wurde ein Vollglasstab aufgeschmolzen, zu einer hauchfeinen Spitze ausgezogen und in den Mikromanipulator eingespannt. Der aus Gefrierewebe angefertigte Schnitt wurde auf einen mit RNaseZap vorbehandelten Objektträger aufgebracht, die Glasspitze mit Hilfe des Manipulators auf den Schnitt aufgesetzt und gewünschte Areale durch gezieltes Abkratzen vom Objektträger abgelöst. Die dabei entstehenden Gewebeflocken bleiben durch wirkende Adhäsionskräfte an der Glasspitze hängen und konnten durch Steuerung des Manipulators in Gefäße mit eiskaltem Fixiermedium überführt werden. Im Anschluss an die Fixierung wurde das Gewebe durch Zentrifugation von der wässrigen Phase getrennt und in eine PCR eingesetzt.

3.4. Arbeiten mit RNA

3.4.1. RNA-Isolation

Für Analysen auf Transkriptebene ist es erforderlich, RNA aus Zelllinien und Geweben zu isolieren. Hierfür wurde der QIAampRNA Blood Mini Kit von Qiagen verwendet. Zur Stabilisierung der RNA erfolgte die Aufnahme der Gefrierschnitte in RNA-Later für eine Übernachtinkubation bei 4 °C. Am darauf folgenden Tag wurde der Überstand durch Zentrifugation abgetrennt, das Gewebe mit Hilfe einer feinen Spritze in RLT-Puffer mit 1 % β -Mercaptoethanol homogenisiert und durch Einfrieren bei - 80 °C zusätzlich aufgeschlossen. Bevor die RNA entsprechend dem Protokoll des Herstellers aufgearbeitet wurde, erfolgte ein 10-minütiger Hitzeschritt bei 37 °C. Nach Elution der Nukleinsäuren mit 50 μ l RNase freiem DEPC-Wasser wurde der RNA-Gehalt der Proben bestimmt und die Eluate bei - 80 °C gelagert.

3.4.2. Reverse Transkription

Um die Expressionsrate einer RNA zu bestimmen, kam deren reverse Transkription zur Herstellung komplementärer DNA (*complementary DNA*, *cDNA*) zum Einsatz (Abbildung 3.5).

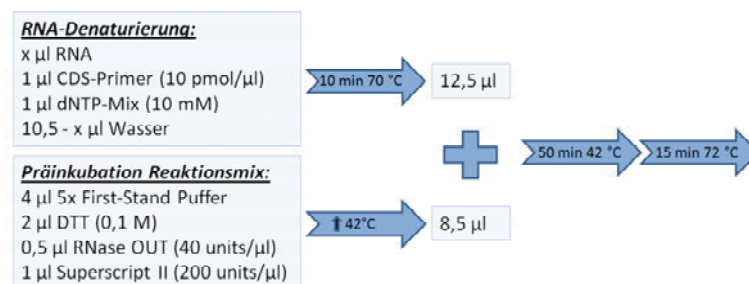


Abbildung 3.5 Ablaufschema einer Reversen Transkription. In 2 parallelen Ansätzen wird RNA denaturiert, um Primerannealing zu ermöglichen und der verbleibende Reaktionsmix auf 42 °C vorgewärmt. Nach Vereinigung beider Ansätze erfolgt die Reverse Transkription der enthaltenen mRNA. Sequenz des CDS-Primers: 5'- AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTAC(T)30VN-3'.

Je nach biologischer Quelle und Zielstellung erfolgte hierfür die Verwendung verschiedener RNA-Ausgangsmengen (300 ng Gewebe-RNA; 1 µg Zelllinien-RNA). Nach Denaturierung der RNA folgte das Abkühlen der Probe auf Eis bevor vorgewärmter Reaktionsmix zugegeben wurde. Ein, der cDNA-Synthese folgender, Hitzeschritt sorgte durch Inaktivierung des Enzyms für den Abschluss der Reaktion.

3.4.3. Multiplex SuperScript One-Step RT-PCR

Neben der unspezifischen Reversen Transkription mit CDS-Primern unter Amplifikation aller enthaltener Poly-A-mRNAs, existiert die Möglichkeit zur produktspezifischen Generierung von cDNA. Hierfür bedarf es des Einsatzes genspezifischer Primer. Dadurch besteht die Möglichkeit, direkt an die cDNA-Synthese im selben Reaktionsansatz einen DNA-Amplifikationsschritt anzuhängen. Aufgrund ihrer unkomplizierten und schnellen Durchführbarkeit und hohen Spezifität war dies die Methode der Wahl zum Nachweis der CAR-Expression in Gewebe. Der Reaktionsansatz basierte auf dem SuperScript One-Step RT-PCR Mix mit Platinum Taq und wurde jeweils in 1-facher Menge direkt auf die Zellen gegeben. Neben einem die Exons 4 - 7 umfassenden CAR-Transkript wurde parallel β -Aktin amplifiziert.

12,5 µl 2x Reaktionspuffer
 0,25 µl MgCl_2 (50 mM)
 0,2 µl RNase Out
 1 µl CAR_4_F (10 pmol/µl)
 1 µl CAR_snPCR_R(i) (10 pmol/µl)
 1 µl β -Aktin_F (10 pmol/µl)
 1 µl β -Aktin_R (10 pmol/µl)
 1 µl Enzym-Mix (SuperScript III, Platinum Taq)
 0,5 µl AmpliTaq DNA Polymerase (5 U/µl)
 6,55 µl H_2O

Nach initialer cDNA-Synthese bei 50 °C für 30 min erfolgte eine 5-minütige Erhitzung auf 94 °C gefolgt von der 15-fachen Abfolge eines Zyklus aus 30 s bei 94 °C, 30 s bei 62 °C und 1 min bei 72 °C. Die Sequenzen verwendeter Primer finden sich in Tabelle 3-4.

Tabelle 3-4: Sequenzen der für die Multiplex SuperScript One-Step RT-PCR verwendeten Primer.

Bezeichnung	Lokalisation	Sequenz
CAR_4_F	Exon 4	5'- ATGTGAACCAAAAGAAGGTTCACTTCC-3'
CAR_snPCR_R(i)	Exon 7	5'- GGCTCTATACTATAGACCCATCCTTGCTC-3'
β -Aktin_F	-	5'- GGACTTCGAGCAAGATATGG-3'
β -Aktin_R	-	5'- GCAGTGATCTCCTTCTGCATC-3'

3.5. Arbeiten mit DNA

3.5.1. DNA Isolation

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli* standen je nach erforderlichem Umfang der DNA-Ausbeute Aufreinigungssets verschiedener Größenordnung zur Verfügung. Alle Proben wurden nach Elution spektrophotometrisch vermessen und bei - 80 °C gelagert.

Die DNA Isolation für qualitative Analysen wurde mittels des QIAprep Spin Miniprep-Kits mit einem eingesetzten Volumen von maximal 2 ml Bakteriensuspension und einer maximalen Aufreinigungskapazität von bis zu 15 µg DNA durchgeführt. Die Anwendung entsprach dem empfohlenen Protokoll des Herstellers und basiert auf einer alkalischen Lyse des Bakterienpellets gefolgt von einer DNA-Adsorption an eine Silicamembran unter hohen Salzkonzentrationen. Nach mehreren Waschschritten konnte die DNA darauf folgend in einem Volumen von 50 µl eluiert werden. Eine quantitative DNA-Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des NucleoBond Xtra Midi-Kits aus etwa 100 ml Bakteriensuspension. Die durchschnittliche Ausbeute des Kits liegt bei etwa 250 µg DNA. Auch hier entsprach das angewandte Protokoll den Empfehlungen des Herstellers. Nach alkalischer Lyse und Klärung des Lysates bindet die DNA an ein Anionenaustauscherharz und wird nach der Entfernung aller störenden Zellbestandteile über einen pH-Wechsel von der Säule eluiert.

3.5.2. Herstellung von Agarosegelen

Zum Nachweis amplifizierter DNA erfolgte die Auftrennung der PCR Produkte mittels Agarosegel. Der Grad des hierbei zunutze gemachten Siebeffektes wird nach gewählter Geldichte bestimmt (% Agarose; w/v) und ermöglicht die Auftrennung von Fragmenten unter 100 bp (hochprozentiges Gel) bis zu mehreren kb (niedrigprozentiges Gel). Zur Gelherstellung wurden TBE-Puffer und Agarose bis zum kompletten Schmelzen der Agarose erhitzt und Verdunstungsverluste durch Zugabe von destilliertem Wasser ausgeglichen.

TBE-Puffer	45 mM Tris
	45 mM Borsäure
	2 mM EDTA pH 8,0

Die Agaroselösung wurde im Anschluss durch vorsichtiges Schwenken in Eiswasser auf unter 50 °C abgekühlt und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Dies ermöglichte die spätere Visualisierung der DNA-Banden unter UV-Licht. Nach dem Auspolymerisieren des gegossenen Gels konnte die DNA – versetzt mit 5 x DNA-Ladepuffer – aufgetragen und mittels Stromfluss aufgetrennt werden. Nachfolgend war es möglich, einzelne Banden unter Zuhilfenahme eines UV-Licht Tisches auszuschneiden, um die darin enthaltene DNA mittels des QIAquick Gel Extraction Kits entsprechend den Herstellerangaben aufzureinigen.

5 x DNA-Ladepuffer	25 mM Tris pH 7,5 150 mM EDTA 0,05 % Bromphenolblau 25 % Glycerol
--------------------	--

3.5.3. Nested-PCR

Zur Parallelamplifikation aller CAR-Isoformen aus HaCaT-cDNA erfolgte eine Nested-PCR unter Verwendung zwei versetzt liegender Primerpaare (siehe Tabelle 3-5).

Tabelle 3-5: Sequenzen der für die Nested-PCR verwendeten Primer.

Bezeichnung	Lokalisation	Sequenz
CAR_Dörner_F	Exon 1	5'- CATGGCGCTCCTGCTGTGCTTCGTGCTCCTGT-3'
CAR_snPCR_R(a)	3'ncr	5'- AGCACAGATGAGACATATGGAGGCTC-3'
CAR_snPCR_F	Exon 1	5'- ATGGCGCTCCTGCTGTGCT-3'
CAR_snPCR_R(i)	Exon 7	5'- GGCTCTATACTATAGACCCATCCTTGCTC-3'

Beide Reaktionen basierten auf Verwendung des PCR SuperMix High Fidelity. Nach Ansatz und Ablauf der PCRs gemäß folgendem Schema (Abbildung 3.6) wurden die entstandenen Produkte über ein Agarosegel aufgetrennt, entsprechende Banden isoliert und die Amplifikate zur Weiterbearbeitung aufgereinigt.

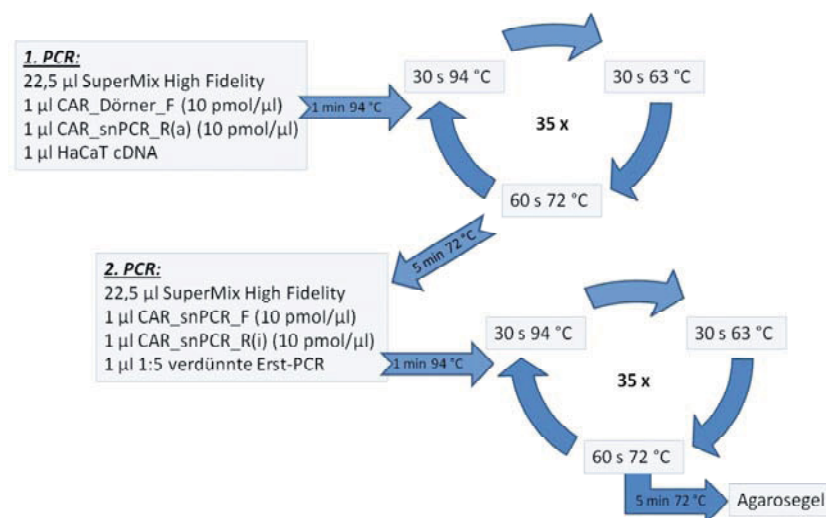


Abbildung 3.6 Amplifikation aller in HaCaT existenten CAR-Isoformen mittels Nested-PCR mit identischer Zyklenfolge. Die Bindungsstelle des zweiten Primerpaars lag nach innen versetzt im Amplifikat der Erst-PCR.

3.5.4. Klonierung

Die Klonierung umfasst das Einbringen eines linearen DNA-Fragments in einen Vektor. Hierfür wurde der TOPO TA Cloning Kit for Sequencing mit linearisiertem pCR4-TOPO-Plasmidvektor und einzelem 3'-Thymidin-Überhang sowie einer kovalent gebundenen Topoisomerase verwendet. Die zu klonierende Sequenz bedarf daher bei glatten Enden das

Anhängen eines einzelnen 5'-Adenin Überhangs. Folgende Bestandteile wurden hierfür gemischt, für 10 min bei 72 °C inkubiert und im Anschluss auf Eis gestellt.

13 µl aufgereinigtes PCR-Produkt
 2 µl GeneAmp 10 x PCR-Buffer II
 4 µl dATP (1 mM)
 1 µl AmpliTaq DNA Polymerase (5 U/µl)

Danach erfolgte die Ligation gemäß folgendem Ansatz. Die Reaktion wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend auf Eis gelagert und final in eine Transformation eingesetzt.

4 µl aufgereinigtes PCR-Produkt mit 3'-Adenin Überhang
 1 µl Salt Solution
 1 µl TOPO-Vektor

3.5.5. Restriktionsverdau

Ein Verdau mittels Restriktionsendonukleasen ermöglicht es, eine DNA-Sequenz an definierten Positionen zu schneiden. Standardplasmide besitzen hierfür eine multiple cloning site (MCS), auf Basis derer ein definiertes Einbringen und Entfernen von Sequenzen mit identischen Schnittstellen in bzw. aus Plasmidkonstrukten ermöglicht wird. Ziel dieser Methode bestand im kontrollierten Verdau isolierter Plasmide aus transformierten Zellen zu Überprüfung der Klonierungseffizienz und zur Auswahl geeigneter Klone. Je nach Ausgangssequenz kamen EcoRI, XbaI und BamHI einzeln oder in unterschiedlichen Kombinationen mit dem jeweils passenden Puffer von NEB zum Einsatz. Der Verdau wurde nach folgendem Schema angesetzt und für 1 - 3 h bei 37 °C inkubiert.

2 µl 10 x NEB-Puffer
 2 µl 10 x BSA
 0,5 - 1 µl Restriktionsenzym (20 U/µl)
 bis 4 µl Plasmid-DNA variabler Konzentration
 H₂O auf 20 µl

Danach erfolgten die Analyse der Produkte mittels Agarosegel sowie die Entscheidung über die Weiterverwendung der einzelnen Klone.

3.5.6. Sequenzierung

Im Anschluss an die Identifizierung geeigneter transformierter Klone erfolgte deren Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode von Sanger [189]. Hierfür wurde der SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit-LC (für 25 - 41 cm Gele) mit IDR800-markierten Primern (Tabelle 3-6) sowie einem „cycle sequencing“ Protokoll verwendet. Ausgehend von Template-DNA und einem Primer pro Reaktion (lineare Amplifikation) erfolgte der

Nukleotideinbau äquivalent zu einer regulären PCR. Statistisch gesehen wurde jedoch im Laufe der Reaktion an jeder Stelle der Sequenz ein Didesoxynukleotid eingebaut. Aufgrund der, diesen ddNTPs fehlenden, OH-Gruppe am 3'-C-Atom, war eine weitere Verlängerung der Nukleotidkette über eine Phosphatgruppe nicht mehr möglich und die Reaktion brach ab. Das daraus resultierende Gemisch unterschiedlich langer DNA-Fragmente konnte anschließend mittels eines 6 % denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgels an einem MWG LICOR4000-System aufgetrennt werden.

Tabelle 3-6: Fluoreszenzmarkierte Primer für den spezifischen Nachweis terminierter Nukleotidketten unterschiedlicher Länge nach Sanger Sequenzierung.

Bezeichnung	Vektor	Sequenz
T7_F	pCR4 TOPO	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T3_R	pCR4 TOPO	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'
M13U_F	pBK-CMV ΔN/S	5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'
pBK_Nhe/Spe_R	pBK-CMV ΔN/S	5'-ATGTCGTAACAACCTCCGC-3'

3.5.6.1. Sequenzierreaktion

Zu Beginn der Sequenzierreaktion erfolgte die Herstellung eines Prämixes aus folgenden Komponenten.

7,2 µl 3,5 x SequiTherm EXCEL II Sequencing Buffer
 2 µl fluoreszenzmarkierter Primer (2 pmol)
 0,5 µg DNA (entspricht ca. 200 fmol)
 1 µl SequiTherm EXCEL II DNA Polymerase
 H₂O auf 17 µl

Pro Sequenzierungsansatz wurden parallel vier Reaktionsgefäße vorbereitet, in diese jeweils 2 µl SequiTherm EXCEL II-LC Termination-Mix für G, A, T oder C vorgelegt und mit je 4 µl des Prämixes vermischt. Nach Überschichtung aller Ansätze mit Liquid Wax erfolgte ein 5-minütiger initialer Denaturierungsschritt bei 95 °C. Dem folgten 30 Zyklen aus 30 s bei 95 °C, 15 s bei 54 °C und 1 min bei 70 °C. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 3 µl Stop/Loading Buffer beendet und konnte nun über ein Gel analysiert werden.

3.5.6.2. Gellauf

Vor der Herstellung eines Sequenziergels ist es essentiell, die gelbegrenzenden Glasplatten vollständig zu säubern und frei von Fusseln zusammen zu setzen. Andernfalls können beim gießen des extrem dünnen Gels Luftblasen entstehen, welche den späteren Lauf behindern. Das Gel setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen.

Sequenziergel	14 g Harnstoff 5 ml Rapid GEL XL Lösung 3,4 ml 10 x TBE LongRun-Puffer 18,7 ml H ₂ O 333,4 µl DMSO 33,4 µl TEMED 233,4 µl 10 % APS (frisch angesetzt)
10 x TBE-LongRun-Puffer	1340 mM Tris 450 mM Borsäure 25 mM EDTA pH 8,5

Nach Polymerisation des Gels wurden die Glasplatten von außen erneut gründlich gesäubert, das Gel in den LICOR 4000 eingebaut und mit dem Zweck der Laserjustierung und Gelerwärmung ein mindestens 1-stündiger Vorlauf mit 1 x TBE LongRun-Puffer bei 1500 V, 35 mA und 40 W gestartet. Im Anschluss erfolgten die Auftragung der Sequenzierreaktionen und der Gellauf unter gleichen Bedingungen über Nacht. Die maximal zu erreichende Leseweite lag bei etwa 700 - 900 Nukleotiden.

3.5.7. Spleißvarianten-spezifische quantitative RealTime-PCR

Zum hochspezifischen Nachweis einzelner CAR-Isoformen erfolgte die Etablierung einer Spleißvarianten-spezifischen quantitativen RealTime-PCR. Das Primerdesign orientierte sich an bereits publizierten Sequenzen [90], welche auf Grund des Ausschlusses möglicher Kreuzreaktivitäten teilweise modifiziert wurden. Schlussendlich basierte das Protokoll auf mehreren Exon-überspannenden Forward-Primern, einem gemeinsamen Reverse-Primer in Exon 7 sowie einer ebenfalls in Exon 7 lokalisierten TaqMan-Sonde (Tabelle 3-7).

Tabelle 3-7: Primer und Sonde für den spezifischen Nachweis einzelner CAR Isoformen mittels Spleißvarianten-spezifischen quantitativen RealTime-PCR. In den Primersequenzen unterstrichene Lücken markieren Exonübergänge.

Spleißvariante	Exon	Oligonukleotid	Sequenz
CAR_2/7_F	2/7	Forward Primer	5'-GAAGGTGGATCAAGTG_GGAAGA-3'
CAR_3/7_F	3/7	Forward Primer	5'-ATTCATCTGGTAGTTCTTG_GGAAGA-3'
CAR_4/7_F	4/7	Forward Primer	5'-CACTTCATGGTTAGCAG_GGAAGA-3'
CAR_4/6_F	4/6	Forward Primer	5'-CCCACTTCATGGTTAGCAG_CTTC-3'
CAR_6/7_F	5	Forward Primer	5'-TTGCGTCTAAACGTTGTCCCTC-3'
CAR_7_R	7	Reverse Primer	5'-TGAATGATTACTGCCGATGTAGC-3'
CAR_7_Taq	7	Sonde	5'-FAM-CACCTCCAAAGAGCCGTACGTCCACTG-TAMRA-3'

Auf der Ebene von Etablierung und Bestimmung der Primer-Effizienzen bildete DNA aus TOPO-Plasmiden (10 pg/µl) die Basis dieser PCR. Die spätere Anwendung der Methode griff auf Gewebe-cDNA (TissueScan RealTime Gene Expression Panel human-48, Origene) und

Produkte der Multiplex SuperScript One-Step RT-PCR zurück. Zum Ausschluss von Kontaminationen durch Produkte vorrausgegangener quantitativer RealTime-PCRs erfolgte die Verwendung des Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG nach folgendem Schema.

12,5 µl Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG
 0,5 µl passiver Referenzfarbstoff ROX
 3,375 µl Spleißvarianten-spezifischer Forward-Primer (10 pmol/µl)
 3,375 µl CAR_7_R (10 pmol/µl)
 0,94 µl CAR_7_Taq (10 pmol/µl)
 1 - 2 µl Template-DNA
 H₂O auf 25 µl

Jede PCR begann mit einem 2-minütigen Abbau bereits Urazil enthaltender Produkte (Dekontamination) bei 50 °C sowie dem Inaktivieren der Urazil-DNA-Glykosylase für 10 min bei 95 °C. Danach erfolgten 45 Zyklen aus 15 s bei 95 °C, 20 s bei 62 °C und 40 s bei 65 °C in einem ABI7300 SDS Cycler. Das Haushaltsgen β -Aktin wurde unter Einsatz desselben Temperaturprotokolls amplifiziert (Power SYBR Green PCR Master Mix) und aus dem Einbau von SYBR Green resultierende Ct-Werte zur Normalisierung heran gezogen. Eine an die Reaktion anschließende Aufschmelzung der DNA bestätigte die Anwesenheit eines einzelnen spezifischen Produkts.

12,5 µl Power SYBR Green PCR Master Mix
 1,25 µl β -Aktin_F (10 pmol/µl)
 1,25 µl β -Aktin_R (10 pmol/µl)
 1 µl Template-DNA
 9 µl H₂O

3.5.8. Bestimmung von Amplifikationseffizienz und relativer CAR-Expression

In die Berechnung der relativen Expressionslevel einzelner Isoformen flossen neben den absoluten Ct-Werten für CAR und β -Aktin auch die Amplifikationseffizienzen der jeweiligen Primer ein. Die Effizienzbestimmung erfolgte durch den Einsatz serieller Verdünnungen entsprechender DNA in die Spleißvarianten-spezifische quantitative RealTime-PCR. Resultierende Ct-Werte wurden gegen den Logarithmus der DNA-Konzentration aufgetragen und die Effizienz (E) der PCR auf Basis des Anstiegs (m) bestimmt.

$$E = 10^{\frac{1}{-m}}$$

Unter Anwendung bekannter Amplifikationseffizienzen für Haushaltsgen (*housekeeping gen*, HKG) und nachzuweisendem Gen (*gene of interest*, GOI) können nun mittels folgender Formel Rückschlüsse auf die relative Expression des GOI gezogen werden.

$$\text{Relative Expression (GOI)} = \frac{E(HKG)^{Ct(HKG)}}{E(GOI)^{Ct(GOI)}}$$

3.5.9. Umklonierung

Um innerhalb eukaryotischer Systeme eine Translation von Konstrukten zu erreichen, bestand Notwendigkeit zur Umklonierung der in pCR4-TOPO-Vektoren vorliegenden CAR-Varianten in Expressionsvektoren. Zum Einsatz kamen hierfür sowohl ein modifizierter pBK-CMV-Vektor [190] als auch ein modifizierter pLXSP-Vektor [191] (Vektorkarten im Anhang). Auf Basis der pCR4-TOPO-Plasmide wurde die CAR-cDNA mittels des PCR SuperMix High Fidelity und für Restriktionsschnittstellen codierenden Primern amplifiziert und über diese Schnittstellen in die Vektoren eingebracht. Entsprechende Primersequenzen mit markierten Restriktionsschnittstellen finden sich in Tabelle 3-8.

Tabelle 3-8: Sequenzen der für die Umklonierung verwendeten Primer.

Bezeichnung	Exon	Sequenz	Enzym
CAR_AUI_F	1	5'-taGAATTCa ATGGCGCTCCTGCTGTGCTT-3'	EcoRI
CAR_Flag4_R	7	5'-gcTCTAGA CTATACTATAGACCCATCCTTGCTCTGTGCTG-3'	XbaI
CAR_BamHI_R	7	5'-ctaGGATCC CTATACTATAGACCCATCCTTGCTCTGTGCTG-3'	BamHI

Während pBK-CMV mit EcoRI und XbaI geschnitten werden konnte musste bei pLXSP neben EcoRI auf BamHI zurück gegriffen werden.

22,5 µl SuperMix High Fidelity
 1 µl CAR_AUI_F (10 pmol/µl)
 1 µl CAR_..._R (10 pmol/µl)
 1 µl pCR4-TOPO-CAR-Plasmid

Einer initialen einminütigen Denaturierung der Probe bei 94 °C folgten 25 Zyklen aus 30 s bei 94 °C, 30 s bei 65 °C und 1 min bei 72 °C. Nach finaler Extension für 5 min bei 72 °C wurden PCR-Ansätze und leere Plasmide 2 - 3 h restriktionsverdaut, präparativ auf einem Agarosegel aufgetrennt und aufgereinigt. Mittels Ligation erfolgte die Verknüpfung von Plasmid und Insert sowie Ausplattierung transformierter Top10 E. coli auf antibiotikahaltigen LB-Platten. Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung auf Richtigkeit überprüft.

4. Ergebnisse

4.1. Isolierung und Klonierung alternativer CAR-Spleißprodukte

Der erste Schritt dieser Arbeit bestand in der Etablierung einer Methode, mittels welcher mehrere bereits in der Literatur beschriebene Spleißvarianten des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors spezifisch nachweisbar gemacht werden können. Ziel hierbei war die Amplifikation der drei löslichen Isoformen CAR2/7, CAR3/7 und CAR4/7 sowie des membranständigen Volllängentranskripts hCAR1 (CAR6/7) innerhalb einer Probe. Eine darauf basierende Quantifizierung dieser Varianten mittels RealTime-PCR ist nur dann valide, wenn jeder Primer spezifisch die ihm zugeordnete Isoform erkennt. Der Ausschluss jedweder Kreuzreaktivitäten war daher für diese Methodik unerlässlich.

4.1.1. Parallelamplifikation aller CAR-Spleißvarianten mittels Nested-PCR

Als Grundlage aller geplanten Experimente waren einzeln in Vektorkonstrukten vorliegende Isoformen des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors angedacht. Hierzu mussten diese aus einer geeigneten Quelle amplifiziert, voneinander separiert und in Plasmide einkloniert werden. Basis hierfür bildete aufgereinigte mRNA von im Labor kultivierten HaCaT-Zellen. Nach Umschreiben dieser in cDNA erfolgten zwei PCRs im nested-Format mit versetzten Primerpaaren am 5'-Ende von Exon 1 und am 3'-Ende von Exon 7. Mittels dieser Methode konnten alle CAR-Varianten mit gemeinsamem Exon 1 und Exon 7 parallel amplifiziert werden. Die gelelektrophoretische Auftrennung der entstandenen Produkte über ein 1 %-iges Agarosegel ist in Abbildung 4.1 exemplarisch dargestellt. Neben den vier erwarteten Produkten zeigte sich regelmäßig eine zusätzliche unbekannte Bande bei etwa 1000 bp.

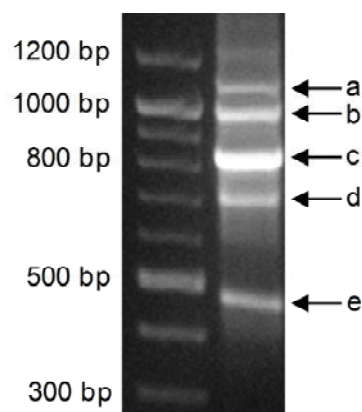


Abbildung 4.1 cDNA Amplifikation aller CAR-Spleißvarianten mit gemeinsamen Exons 1 und 7 aus HaCaT-mRNA. Bande (a) entspricht dem Volllängentranskript CAR6/7 (1098 bp), die Produkte (c) bis (e) den drei bereits beschriebenen löslichen Isoformen [c - CAR4/7, 836 bp; d - CAR3/7, 680 bp; e - CAR2/7, 475 bp]. Zusätzlich zeigte sich regelmäßig ein unerwartetes fünftes Produkt bei knapp 1000 bp (b). In dem im Bild abgetrennten Gelbereich unter 300 bp fanden sich keine weiteren Produkte.

4.1.2. Identifizierung von CAR4/6 als neue Rezeptorisoform

Im Anschluss an die gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte wurden alle Banden einzeln aus dem Gel isoliert und die darin enthaltenen Fragmente aufgereinigt. Im Zuge der Klonierung in den pCR-4-TOPO Vektor zeigte sich trotz vorherigen Anhängens eines 3'-Adenosin-Überhangs zur Steigerung der Klonierungseffizienz nur eine Effizienz von unter 10 %. Zur Vorselektion positiv transformierter Zellklone erfolgten daher Koloniehybridisierungen. Hierbei kann durch die Bindung spezifischer, radioaktiver Oligonukleotidsonden DNA gezielt sichtbar gemacht werden. So findet sich in Abbildung 4.2 der entwickelte Röntgenfilm einer zweigeteilten Membran mit deutlichen radioaktiven Signalen nach 2-stündiger Exposition.

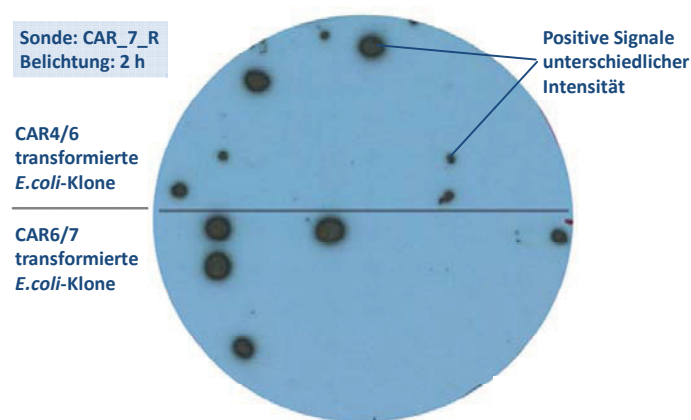


Abbildung 4.2 Koloniehybridisierung von *E. coli* (TOP10) nach Transformation mit klonierten CAR pCR4-TOPO-Konstrukten. Trotz niedriger Effizienz zeigten sich nach Klonierung des 975 bp Fragments (CAR4/6, oben) und des 1098 bp Fragments (CAR6/7, unten) in beiden Bereichen der Membran deutliche Signale nach 2-stündiger Exposition.

Im oberen Abschnitt der Membran wurde die Klonierung des 1000 bp großen Fragments überprüft, im unteren Abschnitt die des 1098 bp-Produkts. Zur besseren Übersicht und Verständnis erfolgte in dieser Abbildung bereits die Verwendung der Bezeichnungen CAR4/6 (975 bp Produkt) und CAR6/7 (1098 bp Produkt). Beide Reaktionen resultierten in der Identifizierung CAR4/6- und CAR6/7-positiver Klone. Äquivalente Hybridisierungen ermöglichten auch die Identifizierung von CAR4/7- und CAR2/7-positiven Klonen. CAR3/7-Konstrukte wurden freundlicherweise von Frau Dr. A. Dörner zur Verfügung gestellt [66].

CAR-positive Klone wurden im Anschluss amplifiziert, mittels Restriktionsverdau überprüft und enthaltene Plasmid-DNA aufgereinigt. Die nachfolgende Sequenzierung bestätigte die korrekten Sequenzen des Volllängentranskripts sowie der löslichen Isoformen und identifizierte das etwa 1000 Basen umfassende Produkt als eine weitere Isoform des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors. Die entsprechende 975 bp große cDNA setzt sich aus den Sequenzen der Exons 1 - 4, 6 und 7 zusammen. Aufgrund des Ausspleißens von Exon 5 und

dem daraus resultierenden direkten Übergang von Exon 4 zu 6 sowie in Anlehnung an die bereits verwendete Nomenklatur bekam diese Variante die Kennzeichnung CAR4/6 (GenBank GU474812). Ein partieller Sequenzvergleich zu CAR6/7 findet sich in Abbildung 4.3.

```

CAR 6/7: 5'-...TTCAACTGTCAGATATTGGCACATATCAGTGCAAGTGAAGAAAGCTCCTGGTGTGCAAATAAGAAGATTCATCTG
CAR 4/6: 5'-...TTCAACTGTCAGATATTGGCACATATCAGTGCAAGTGAAGAAAGCTCCTGGTGTGCAAATAAGAAGATTCATCTG

      GTAGTTCTTGTTAAGCCTTCAGGTGCGAGATGTTACGTTGATGGATCTGAAGAAATTGGAAGTGACTTTAAGATAAAATGT
      GTAGTTCTTGTTAAGCCTTCAGGTGCGAGATGTTACGTTGATGGATCTGAAGAAATTGGAAGTGACTTTAAGATAAAATGT
      GAACCAAAGAAGGTTCACTTCCATTACAGTATGAGTGGCAAAATTGTCTGACTCACAGAAATGCCCACTTCATGGTTA
      GAACCAAAGAAGGTTCACTTCCATTACAGTATGAGTGGCAAAATTGTCTGACTCACAGAAATGCCCACTTCATGGTTA
      GCAGAAATGACTTCATCTGTTATATCTGTAAAAATGCCTCTTCTGAGTACTCTGGGACATACAGCTGTACAGTCAGAAAC
      GCAG-----
      AATGCCTCTTCTGAGTACTCTGGGACATACAGCTGTACAGTCAGAAACAGAGTGGGCTCTGATCAGTGCCTGTTGCGCTGA
      -----
      AACGTTGTCCCTCCTTCAAATAAGCTGGACTAATTGCAGGAGCCATTATAGGAACCTTGCTTGCTCTAGCGCTCATT...
      -----CTTCAAATAAGCTGGACTAATTGCAGGAGCCATTATAGGAACCTTGCTTGCTCTAGCGCTCATT...

```

Exon 3

Exon 4

Exon 5

Exon 6

Abbildung 4.3 Partieller Sequenzvergleich der CAR Isoformen 4/6 und 6/7. Dargestellt sind Sequenzen von Exon 3 bis 6. Exons 4 und 6 sind blau hervorgehoben und gehen bei CAR4/6 direkt ineinander über. Ein Nukleotidaustausch für CAR4/6 bei Position 363 in Exon 3 ist rot markiert. Der Verlust von Exon 5 führt nicht zu einer Verschiebung des Leserasters.

Neben einem Nukleotidaustausch an Position 363 (Exon 3) finden sich keine weiteren Sequenzunterschiede zum Vollängentranskript. Desweiteren führt der Verlust von Exon 5 nicht zu einer Verschiebung des Leserasters. Auf Proteinebene besitzen beide Isoformen daher einen identischen C-Terminus. Eine denkbare Struktur des CAR4/6-Proteins ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

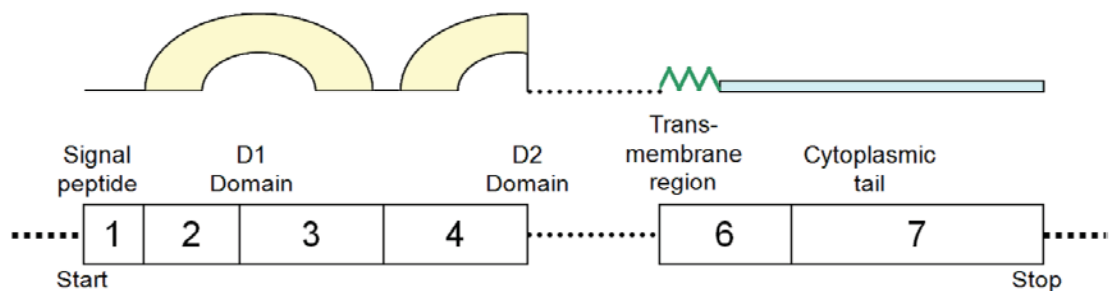


Abbildung 4.4 Hypothetische Struktur des CAR4/6-Proteins. Außer einer verkürzten D2-Domäne im extrazellulären Teil des Proteins gibt es keine strukturellen Unterschiede zu CAR6/7.

Transmembranregion und carboxyterminale cytoplasmatische Domäne sind homolog zu CAR6/7. Der aminoterminal lokalisierte, extrazelluläre Teil des CAR4/6-Proteins enthält neben der kompletten D1-Domäne eine verkürzte D2-Domäne. In wie weit sich diese Änderung auf Proteinfaltung, interzelluläre Wechselwirkungen und/oder Funktionalität des

Proteins auswirkt, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit bereits teilweise überprüft. Genaue strukturelle Analysen des gefalteten Proteins wurden noch nicht vorgenommen und müssen dieser Arbeit folgen.

4.1.3. Design spleißvarianten-spezifischer Primer für die quantitative RealTime-PCR

Der nächste Arbeitsschritt bestand im Design spleißvarianten-spezifischer Primer für die unabhängige Quantifizierung einzelner CAR-Isoformen. Dies geschah in Anlehnung an eine Publikation um die Gruppe von Reimer [90]. Nach Überprüfung der in dieser Arbeit beschriebenen exonüberspannenden Primersequenzen auf Kreuzreaktivitäten zu verwandten Isoformen wurden die Primer für CAR2/7, CAR3/7 und CAR4/7 modifiziert, Primer für CAR4/6 und CAR6/7 neu etabliert, reverse Primer und Sonde (Exon 7) jedoch ohne Änderung übernommen. Modifikationen beinhalteten eine Reduktion der gemeinsamen Nukleotide in Exon 7 auf jeweils sechs Basen. Die auf diese Weise erreichte Verkürzung der gemeinsamen Bindestellen sollte eine Verringerung der Kreuzreaktivitäten erzielen. In Tabelle 4-1 aufgeführte Ct-Werte zeigen, dass auch die veränderten Primer neben ihrer spezifischen löslichen CAR-Isoform teilweise immer noch verwandte Varianten erkennen. Allein die Primersequenzen für CAR4/6 (Exonübergang 4-6) und CAR6/7 (Exon 5) erwiesen sich als geeignet für eine spezifische Amplifikation des jeweiligen Konstrukts.

Tabelle 4-1 Ct-Werte nach qRT-PCR verschiedener CAR-Isoformen (jeweils 1 ng) amplifiziert mit je einem spleißvarianten-spezifischen Primer.

Primer	Plasmide				
	2/7	3/7	4/7	4/6	6/7
2/7	24.55	43.03	-	-	-
3/7	42.92	26.28	-	-	-
4/7	43.42	-	27.76	39.70	35.49
4/6	-	-	-	20.83	-
6/7	-	-	-	-	26.53

Unter Berücksichtigung oben gezeigter Ergebnisse und im Hinblick auf das Ziel einer Quantifizierung auf höchst spezifischem Niveau resultierten diese Daten im Ausschluss der Analyse löslicher CAR-Varianten. Trotz deutlich reduzierter Kreuzreaktivitäten ist nicht zu gewährleisten, dass mittels dieser Primer ermittelte mRNA-Mengen den tatsächlich in der Probe vorhandenen Mengen entsprechen. Eine Verfälschung der Ergebnisse ist nicht auszuschließen. Im weiteren Verlauf erfolgte daher eine detaillierte Betrachtung von CAR4/6 im direkten Vergleich zum Vollängentranskript.

4.1.4. Bestimmung von Amplifikationseffizienzen der qRT-PCR

Eine relative Quantifizierung von PCR Produkten mittels RealTime-PCR ist mit Hilfe von, auf endogene Kontrollen normalisierten, Ct-Werten möglich. Für valide Ergebnisse erfordert dies die Kenntnis der Amplifikationseffizienzen (E) des Ziel- und Referenzgens. Bei voller Effizienz findet pro Zyklus eine Verdopplung statt ($E = 2$). Nach 3,33 Zyklen liegt somit eine Verzehnfachung vor. Sind mehr als 3,33 Zyklen notwendig, um eine DNA auf das zehnfache zu amplifizieren, ist die Effizienz der entsprechenden PCR geringer ($E < 2$).

In dieser Arbeit erfolgte die Effizienzbestimmung auf Basis von HaCaT-cDNA (β -Aktin; Stock: 2 μ l cDNA aus 1 μ g Gesamt-RNA/20 μ l) und pCR4-TOPO-Plasmiden (CAR4/6, CAR6/7; Stock: 10 pg/ μ l). Nach schrittweiser Verdünnung (1:2 bzw. 1:10) des entsprechenden Templates und anschließender qRT-PCR wurden mittels linearer Regression Standardkurven erstellt (Abbildung 4.5 A). Der Anstieg (slope) entspricht der für eine Verzehnfachung benötigten Zyklenanzahl. Im abgebildeten Fall lag dieser Wert über 3,33, die Effizienz der PCR somit unter zwei. In Mittelung von jeweils 10 Bestimmungen ergaben sich die Amplifikationseffizienzen für β -Aktin ($E = 2$), CAR6/7 ($E = 2$) und CAR4/6 ($E = 1,96$).

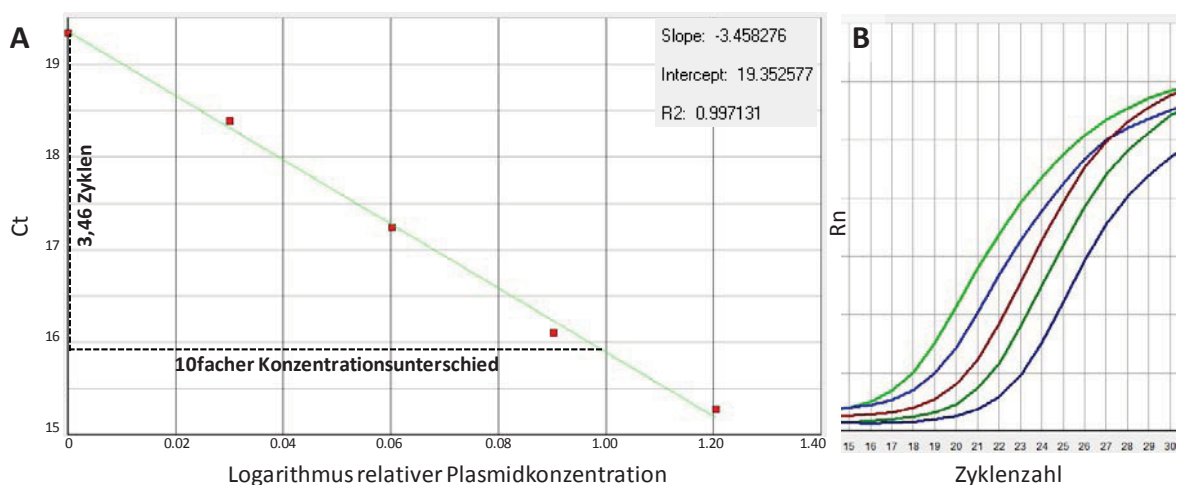


Abbildung 4.5 Effizienzbestimmung von qRT-PCR Primern. A: Lineare Regression einer Verdünnung von CAR4/6 pCR4-TOPO. Aufgetragen ist Ct-Wert (Punkt des Signalanstiegs über Schwellenwert) gegen den relativen Logarithmus der Plasmidkonzentration. Der Anstieg liegt mit 3,46 über dem Idealwert von 3,33. Der Determinationskoeffizient R2 ist sehr nah an 100 % (≈ 1). Ein linearer Zusammenhang zwischen Plasmidkonzentration und Ct-Wert ist damit belegt. B: Standardkurve eines relativen Fluoreszenzsignals des Reporterfarbstoffs (Rn) nach entsprechender Zyklenzahl. Jede Verdopplung der Konzentration bewirkt eine Verschiebung der Kurve um etwa 1 Ct nach links.

Abbildung 4.5 B zeigt den Anstieg relativer Fluoreszenzsignale einzelner Verdünnungen in Relation zum Ct-Wert. Jede Verdopplung der Konzentration bewirkt eine Verschiebung der Kurve um etwa 1 Ct nach links.

4.1.5. Validierung der Reaktionsspezifität

Um eine Streuung der Ct-Werte bei mehrfacher Amplifikation einer einzelnen Probe auszuschließen, erfolgte vor dem Einstieg in mRNA-Analysen eine Validierung der Reaktionsspezifität. In Anlehnung an das im Anschluss verwendete Protokoll der Gewebeaufarbeitung und zum Einschluss eventuell auftretender Störfaktoren wurde hierfür direkt auf mikroseziertes Gewebe zurück gegriffen. Da bei Anwendung der Mikrodisektion die eingesetzte Zellzahl pro Reaktion nicht direkt nachvollziehbar war, wurden alternativ die Menge der in das Gefäß überführten Gewebeflocken gezählt. So konnte gewährleistet werden, dass der Amplifikation in etwa gleiche Ausgangsmengen zugrunde lagen. Ein späterer Abgleich über β -Aktin-Expression bestätigte die Anwendbarkeit dieser Methode. Im Zuge der Validierung wurden aus Gewebe isolierte Areale gleichmäßig auf 2 Reaktionsgefäße aufgeteilt und unabhängig voneinander mittels 1step seminested RT-PCR amplifiziert. Einige Beispiele für auf diese Weise generierte Ct-Werte sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2 Reaktionsspezifität der 1step seminested RT-PCR an mikroseziertem Material (Doppelbestimmung).

Probe	Ct β -Aktin	Ct 4/6	Rel. 4/6 Expr.	Ct 6/7	Rel. 6/7 Expr.
1	17,37	-	-	28,84	3,52E-04
2	16,58	-	-	28,71	2,23E-04
3	14,46	39,94	4,78E-08	26,83	1,89E-04
4	14,39	40,19	3,85E-08	26,05	3,09E-04
5	12,26	33,96	5,83E-07	22,45	8,56E-04
6	9,57	31,41	5,02E-07	22,04	1,76E-04

Farblich identisch unterlegte Daten resultierten aus einer Doppelbestimmung. Die relativen Expressionswerte (Rel. 4/6 Expr. und Rel. 6/7 Expr.) der ersten beiden Probenpaare stimmten nahezu exakt überein. Bei den Proben fünf und sechs variierte sowohl der Ct-Wert für β -Aktin als auch die relative Expression für CAR6/7 ein wenig. Eine, wie für später durchgeführte mRNA-Analysen angewandte, logarithmische Auftragung der Daten macht deutlich, dass die Abweichung nur relativ kleine Effekte hätte. Diese Ergebnisse bestätigen die Reproduzierbarkeit der Amplifikation spezifischer CAR-Isoformen direkt aus Gewebe. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde sich daher auf eine Einzelbestimmung der Werte gestützt.

4.2. Endogene Expression des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors

4.2.1. CAR-Expression im humanen Normalgewebe

An dieser Stelle stand nun die Fragestellung, ob CAR4/6 ein Artefakt in immortalisierten Zelllinien darstellt oder endogen in humanen Geweben exprimiert wird. Ein cDNA-Array über 48 Normalgewebe (TissueScan RealTime Gene Expression Panel human-48, Origene) sollte darüber erste Auskunft geben. Dieser enthielt pro Gewebe jeweils 3 - 6 ng bereits auf β -Aktin normalisierte, lyophilisierte cDNA eines Patientenpools variabler Ethnizität. Die

Spleißvarianten-spezifische quantitative RealTime-PCR für CAR4/6 und CAR6/7 zeigte, dass in 42 der 48 Gewebe CAR6/7 zwischen Zyklus 30 und 35 nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4.6).

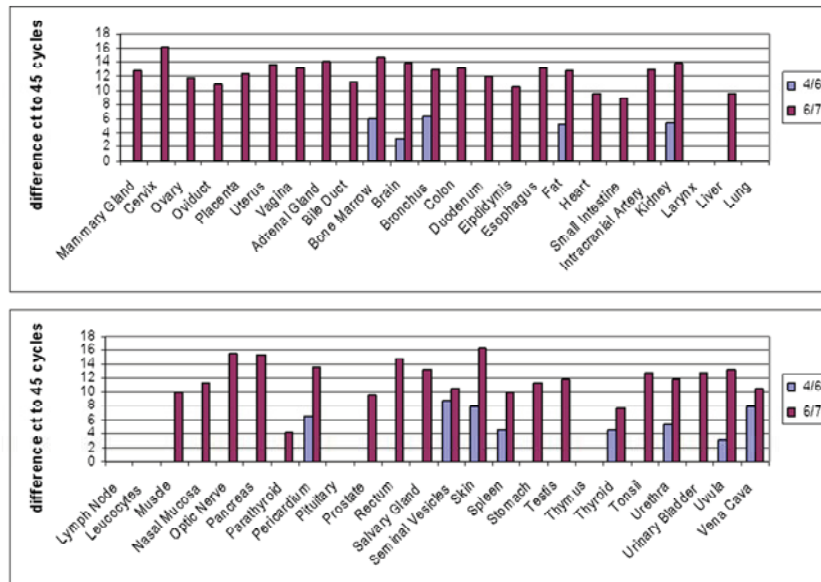


Abbildung 4.6 CAR-Expressionsanalyse in humanen Normalgeweben. cDNA aus 48 Normalgeweben eines kommerziellen Arrays (Origene HMRT101) wurden für CAR4/6 und CAR6/7 amplifiziert. Aufgrund der bereits vorliegenden Normierung auf β -Aktin erfolgte statt der relativen Quantifizierung nur die Auftragung der Differenz aus Ct-Werten zur Gesamtzyklenzahl (45).

Nur Kehlkopf, Lunge, Lymphknoten, Leukozyten, Hypophyse und Thymus ergaben kein PCR-Produkt. Hinweise auf die Expression der neuen Spleißvariante CAR4/6 konnten in 13 Geweben gefunden werden. Im Gegensatz zu CAR6/7 lag das Expressionslevel jedoch mit Ct-Werten zwischen 36 und 42 deutlich niedriger. Dieses Ergebnis impliziert, dass die neue Isoform von CAR nicht nur in HaCaT-Zellen, sondern - auf einem niedrigen Level - auch in einigen humanen Normalgeweben exprimiert wird. Alle gynäkologischen Gewebe erwiesen sich als CAR4/6-negativ.

4.2.2. CAR-Expression in Zelllinien

Um geeignete Zelllinien für funktionelle Assays zu finden, wurden im Labor kultivierte Zellen verschiedenster Entitäten auf die Expression von CAR4/6 und CAR6/7 hin überprüft. Ziel war die Identifizierung von Linien mit möglichst geringer Expression beider Isoformen, da eine spätere ektopische Expression des Gens dann maximale Effekte hervor zu rufen vermag. Abbildung 4.7 zeigt mRNA-Analysen 11 unterschiedlicher Zelllinien. Die in der Abbildung markierten HT1080-Fibrosarkomzellen zeigten genau diese Eigenschaften (rechter Pfeil). Neben der kaum nachweisbaren Expression von CAR4/6 ergab auch die Amplifikation des Vollängentranskripts nur ein sehr schwaches Signal. Aufgrund einer ebenfalls schwachen

mRNA-Expression endogenen CARs wurde als zweite Linie HeLa ausgewählt (linker Pfeil). Als Epithelzellen des Zervixkarzinoms bildete sie ein Modellsystem für die Untersuchung funktioneller Einflüsse von ektopisch exprimiertem CAR auf die Zervix.

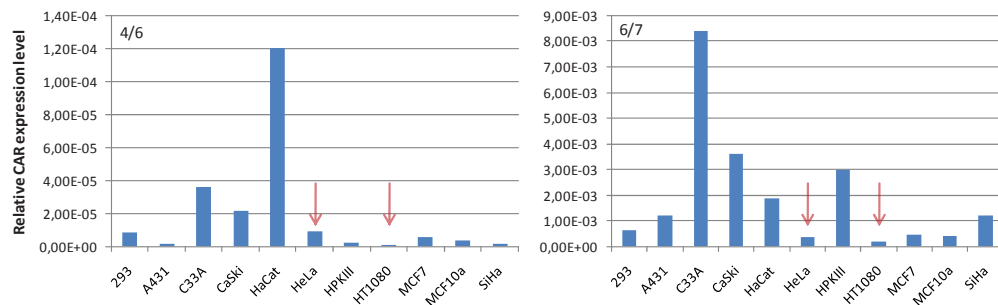


Abbildung 4.7 CAR-Expressionsanalyse in Zelllinien unterschiedlicher Entität. Dargestellt sind relative Expressionen normiert auf β -Aktin. Der linke Graph zeigt mRNA-Expression von CAR4/6. HaCaT als ursprüngliche Quelle dieser Isoform zeigt die mit Abstand höchste Expression. Ein sehr niedriges Signal erzeugten A431, HPKIII, HT1080 und SiHa. Rechts dargestellt ist die Expression von CAR6/7-mRNA. Die geringsten Levels wurden von HeLa und HT1080-Zellen erzeugt. Für beide Linien erfolgte eine Markierung innerhalb der Grafik (Pfeil).

An diese Arbeit schlossen sich immuncytochemische Analysen mehrerer Zelllinien an. Denn nur Zellen, die CAR auch auf Proteinebene exprimieren, sind in der Lage, funktionell wirksam zu werden. Neben den beiden bereits nach qRT-PCR ausgewählten Kulturen entschieden wir uns im Laufe der folgenden Arbeiten für die Verwendung von drei weiteren Linien: die deutlich CAR negative Melanomzelllinie MDA_MB435S, SW756 als zusätzliches Beispiel HPV-induzierter Tumorentstehung und NIH3T3-Mausfibroblasten als im Labor etabliertes Modell für ankerungsunabhängiges Wachstum im Weichagar. Deren endogene CAR-Expression war wie auch für HT1080 und HeLa immuncytochemisch unter der Nachweisgrenze (Abbildung 4.8). Allein HaCaT exprimierte CAR wie erwartet auf einem hohen Niveau.

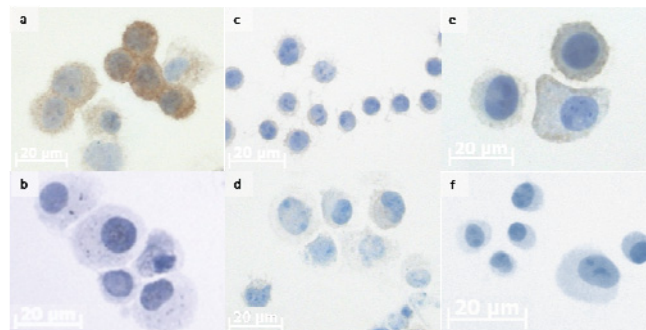


Abbildung 4.8 Expression von CAR nach immuncytochemischer Markierung mit Anti-CAR H300. Nur HaCaT konnte in diesem Kollektiv eindeutig als CAR-positive Zelllinie charakterisiert werden (a). Sowohl NIH3T3 (b), HT1080 (d) MDA_MB435S (f) als auch die zervikale Zelllinie HeLa (c) waren immuncytochemisch CAR-negativ. SW756 als zweite Linie zervikalen Ursprungs zeigte teilweise dezente Signale (e). Die unterschiedliche Größe der Maßstabsbalken resultierte aus der individuellen Vergrößerung einzelner Zellausschnitte aus den entsprechenden Bildern (Ursprungsvergrößerung 10 x 40-fach).

4.2.3. CAR mRNA-Expression im Verlauf der Zervixkarzinogenese

Zwecks Aufklärung einer möglichen Rolle von CAR4/6 in der Zervixkarzinogenese wurde im Anschluss die Expression beider Spleißvarianten in normalem Zervixepithel, hochgradigen zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN2/3) und im Zervixkarzinom untersucht. Zur Generierung von Analysematerial möglichst hoher Tumorzellichte erfolgte hierfür der Einsatz manueller Mikrodisektion von Tumorarealen aus Gefrierschnitten. Dies garantierte einen sehr hohen Tumorzellanteil. Um die Qualität der enthaltenen RNA möglichst hoch zu halten, wurde die Aufarbeitung gänzlich unbearbeiteter Schnitte bevorzugt. Wie Abbildung 4.9 zeigt, waren mittels Phasenkontrast Schnittmorphologie und Tumorzellverteilung auch ohne Färbung gut zu erkennen.

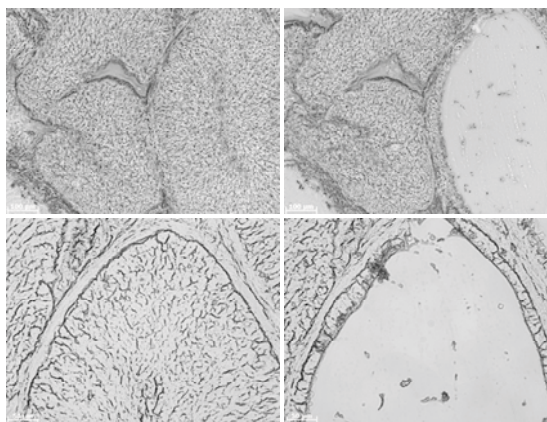


Abbildung 4.9 Phasenkontrastmikroskopie unbearbeiteter Zervixkarzinome im Gefrierschnitt. Oben: Übersicht eines Tumorareals vor (links) und nach (rechts) manueller Mikrodisektion (10 x 10-fach Vergrößerung). Unten: 10 x 20-fache Vergrößerung oben dargestellter Tumoringenue (Arbeitsvergrößerung). Aufgrund der guten Kontraste war eine Aufarbeitung der Schnitte ohne Färbung zu bewerkstelligen (Axioplan2, Zeiss; AxioVision Rel. 4.8).

Mittels dieser Methode wurden 66 Biopsien aufgearbeitet. Dieses Kollektiv setzte sich aus 7 zervikalen Epithelien ohne pathologischen Befund, 12 CIN 2/3 und 47 Plattenepithelkarzinomen der Zervix zusammen. Letztere splitteten sich in 16 Tumore mit FIGO T1, 14 mit FIGO T2 und 17 mit FIGO T3/T4 auf. Die relativen Expressionslevel von CAR4/6 und CAR6/7 normalisiert auf β -Aktin sind in Abbildung 4.10 dargestellt. Der Auswertung liegt eine homogene Verteilung der Ct-Werte für β -Aktin in allen Probenkollektiven zugrunde (siehe Anhang). In der Gruppe hochgradiger Tumoren zeigten sich zwischen T3 und T4 keine Unterschiede in Stärke und Prozentsatz der CAR-Expression. Aufgrund recht geringer Fallzahlen wurden diese daher für weitere Analysen zu einem Kollektiv zusammen gefasst.

In gesundem Zervixepithel war CAR4/6-Expression in keiner Probe nachweisbar. Im Verlauf der Tumorprogression entwickelten jedoch 42 % der untersuchten CIN2/3-Biopsien eine deutliche Expression dieser Isoform. Mit 64 - 76 % lag der Prozentsatz CAR4/6-positiver

Tumorproben noch einmal um einiges höher (T1 = 69 %, T2 = 64 %, T3/T4 = 76 %). Ein paarweiser Vergleich der CAR4/6-Expression einzelner Subgruppen zeigte signifikante Unterschiede zwischen Normalepithel und krankhaft veränderten Geweben (Mann-Whitney-U Test, $p < 0,001$). Im Vergleich von CIN2/3 und zervikalen Karzinomen trat keine signifikante Verschiebung der Werte auf. Im Gegensatz zu CAR4/6 konnte CAR6/7 in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied im Vergleich von Normalgewebe zu CIN2/3 und Tumor offenbarte sich auch für diese Isoform ($p < 0,05$). Allerdings ergaben sich auch hier keine Signifikanzen im Vergleich Präkanzerose zu Tumor.

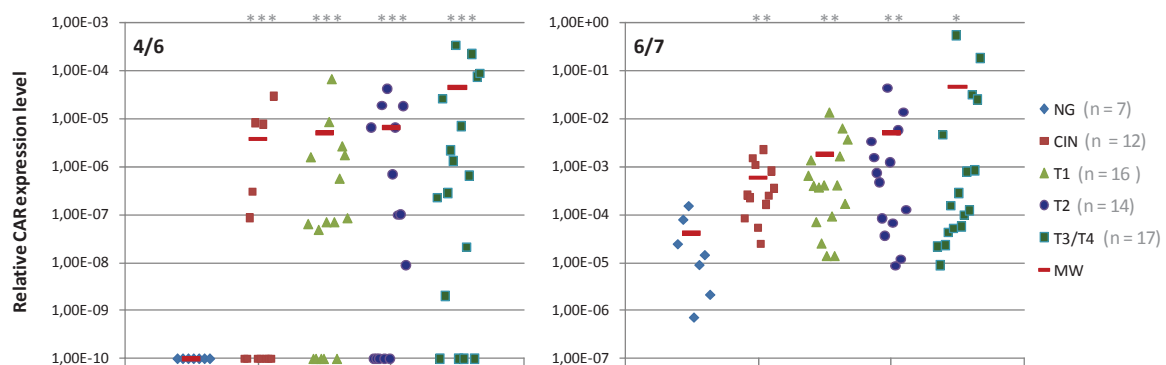


Abbildung 4.10 CAR-Expression in Zervixbiopsien verschiedener FIGO-Stadien. Relative Expressionslevel von CAR4/6 (links) und CAR6/7 (rechts) wurden für gesundes Zervixepithel, CIN2/3 und Zervixkarzinome (CxCa) verschiedener FIGO-Stadien (T1 - T3/T4) ermittelt. CAR-Expressionswerte (Ct) wurden auf β -Aktin-Expression normalisiert. Mittelwerte (MW) für Präkanzerosen und CxCa liegen im Vergleich zum Normalgewebe (NG) signifikant höher (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; Mann-Whitney-U Test).

Alternativ wurden die Tumordaten nach Nodalstatus aufgeschlüsselt und in Abbildung 4.11 zusammengefasst. Den Ausgangspunkt bildete die Gegenüberstellung nodalnegativer (N0) und nodalpositiver (N1) Tumore innerhalb einzelner FIGO-Kollektive. Da für die ursprüngliche Auswahl der Tumore das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen nicht relevant war, kam es an dieser Stelle nun teilweise zu stark differierenden Gruppengrößen. So fanden sich für FIGO T2 nur 2 nodalnegative Tumoren. Dies wiederum erschwerte eine statistische Auswertung enorm. Im oberen Teil der Grafik (Abbildung 4.11 A) wurden die Expressionsdaten für CAR4/6 zusammengefasst. Sowohl für FIGO-Stadium T2 als auch T3/T4 zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Expression mit Entwicklung von Lymphknotenmetastasen. Aufgrund der geringen Gruppengröße war eine statistische Auswertung für das T2-Kollektiv nicht möglich. Der Vergleich vorhandener mRNA-Mengen innerhalb des T3/T4-Kollektivs erzielte jedoch eine Signifikanz von $p < 0,05$ (Mann-Whitney-U Test).

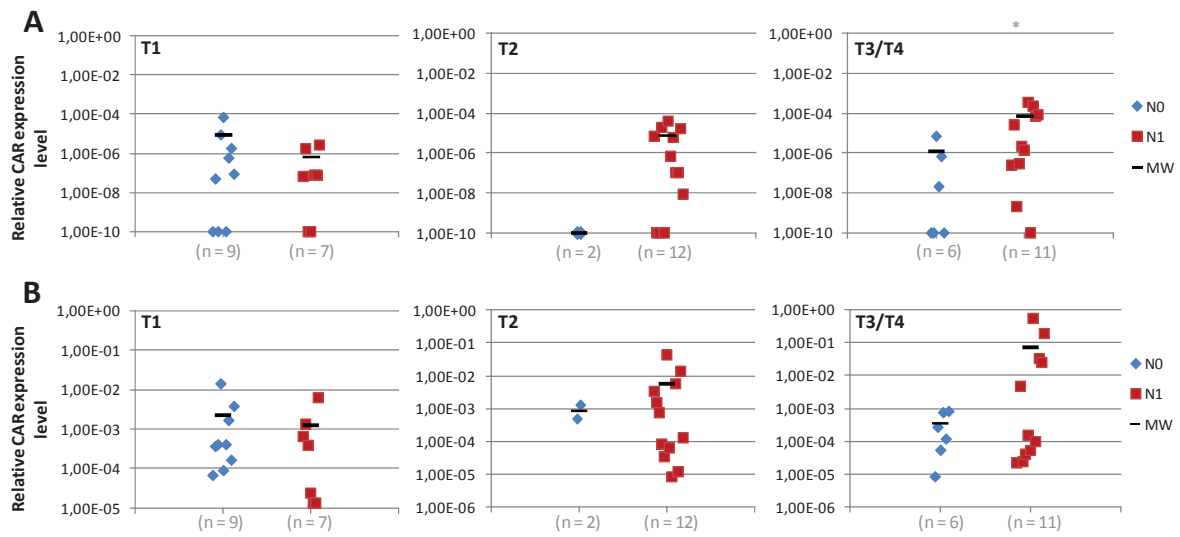


Abbildung 4.11 CAR-Expression in Zervixbiopsien im Vergleich zum Nodalstatus. Relative Expressionslevel von CAR4/6 (A) und CAR6/7 (B) wurden für nodalnegative (N0) und nodalpositive (N1) Tumore verschiedener FIGO-Stadien ermittelt. CAR Expressionswerte (Ct) wurden auf β -Aktin normalisiert. Mittelwerte (MW) für N1 liegen im Vergleich zu N0 bei T2 und T3/T4 höher (* $p < 0.05$ bei CAR4/6 T3/T4; Mann-Whitney-U Test).

Im zweiten Teil der Abbildung (B) ist die CAR6/7-Expression zusammen gefasst. Auch hier zeigte sich, neben einer nahezu gleich bleibenden Expression für T1, ein mit Streuung des Tumors in die Lymphknoten einhergehender Anstieg der RNA-Level bei T2 und T3/T4. Statistische Signifikanzen waren an dieser Stelle für keine der untersuchten Gruppen belegbar.

4.2.4. CAR-Proteinexpression im Verlauf der Zervixkarzinogenese

Mit dem Ziel der Validierung oben beschriebener mRNA-Daten bestand der nächste Schritt in der immunhistochemischen (IHC) Analyse zervikalen Gewebes. Eine diesbezügliche Fragestellung orientierte sich an der Erwartung, neben einem Anstieg der mRNA-Expression im Verlauf der Ausbildung von Lymphknotenmetastasen und der Tumorentstehung auch eine mögliche Zunahme der Signalintensität auf Proteinebene nachweisen zu können. Hierfür wurden immunhistochemische Analysen zervikaler Tumore mit negativem (N0) und positivem (N1) Nodalstatus vorgenommen. Für diesen Vergleich standen neben 25 unfixierten Gefriergeweben (3 x normal, 10 x N0, 12 x N1) auch 24 formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Gewebe (FFPET; 3 x normal, 9 x N0, 12 x N1) zur Verfügung. Diese wurden aufgrund des deutlich besseren Erhalts der Gewebemorphologie und daraus resultierender besserer Schnittqualität in die IHC-Analysen eingeschlossen. Aufgrund unterschiedlicher Zugänglichkeiten der Gewebe erfolgte die Markierung mittels zwei verschiedener Anti-CAR-Antikörper. Der paraffingängige, polyklonale Kaninchen-Antikörper H300 eignete sich zum Nachweis aller CAR-Isoformen und generierte Signale, die sich aus

der Summe der im Gewebe vorhandenen CAR-Proteine zusammensetzen. Im Gegensatz dazu erkannte der murine, monoklonale Antikörper RmcB nur nicht-denaturiertes Volllängenprotein (eigene Daten, siehe Abbildung 4.20 im weiteren Verlauf) und war damit geeignet, Auskunft über die Expression dieser einzelnen Isoform in Gefrierewebe zu geben. Die Intensitäten der hervorgerufenen Signale beider Antikörper sind nicht miteinander vergleichbar. Während H300 generell ein eher schwaches Signal erzeugt, ist die Färbung nach Inkubation mit RmcB meist im oberen Bereich der Intensitäten anzusiedeln. Die Auswertung erfolgte daher für jeden Gewebetyp separat.

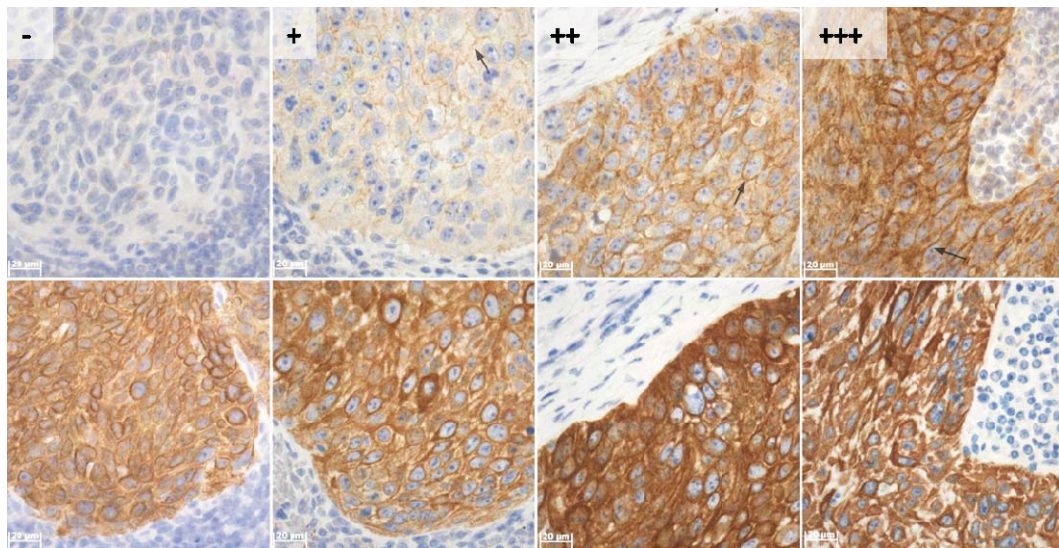


Abbildung 4.12 Markierungsintensitäten nach Färbung von FFPE (CxCa) mit Anti-CAR H300 (oben) und Panzytokeratinmarker AE1/3 (unten). Während Zytokeratin homogen auf etwa demselben Level exprimiert wird, steigen die Intensitäten der CAR-Färbung von links nach rechts [(-) negativ; (+) schwach positiv; (++) mäßig positiv; (+++) stark positiv]. Klare Beispiele membranständiger Lokalisation sind mit einem Pfeil markiert. (Axioplan2, Zeiss; AxioVision Rel. 4.8; 10 x 40-fach vergrößert).

Abbildung 4.12 zeigt anhand von FFPE beispielhaft den Immunoscore für die Zuordnung der Färbeintensitäten nach CAR-Markierung (oben). Die membranständige Lokalisation des Rezeptors war in zahlreichen Tumorarealen deutlich zu erkennen (Pfeile). Zur besseren Lokalisierung im Schnitt enthaltener Tumorzellen wurden zusätzliche Reihenschnitte mit dem Panzytokeratinmarker AE1/3 angefärbt. Dieser ist in der Lage, sämtliche Gewebe epithelialen Ursprungs zu erkennen. Im unteren Teil von Abbildung 4.12 finden sich die im Reihenschnitt äquivalenten, AE1/3-positiven Tumorinseln. Die Intensitäten dieser Färbung lagen regelmäßig in einem hohen Bereich. Für jede Immunmarkierung wurden außerdem Negativkontrollen ohne Zugabe des Primärantikörpers mitgeführt, um mögliche Hintergrundsignale des Sekundärantikörpers aufzudecken. Weiterhin erfolgte für alle Paraffinschnitte eine zusätzliche Hämatoxylin-Eosin-Färbung zur antikörperunabhängigen Visualisierung der Tumorareale (Abbildung 4.13).

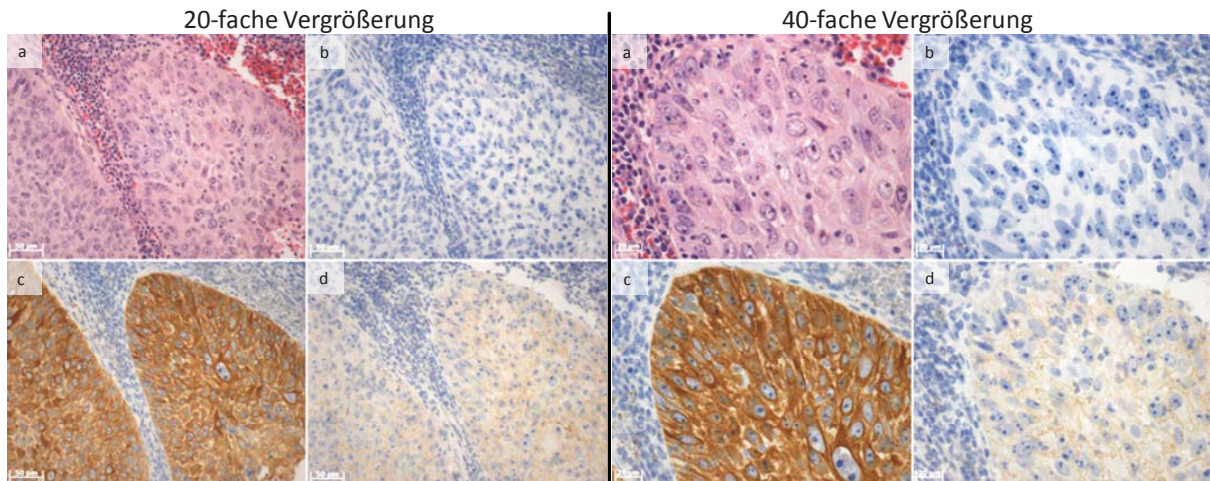


Abbildung 4.13 Immunhistochemie formalinfixierter und in Paraffin eingebetteter CxCa. Neben einer Färbung von AE1/3 (c) und CAR (d; Klon H300) erfolgte die Durchführung einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a) und die Mitführung einer Negativkontrolle (b; ohne Primärantikörper). Dargestellt sind identische Tumorareale nach 10 x 20-facher (links) und 10 x 40-facher (rechts) Vergrößerung.

Mit p16 und Ki67 standen uns zwei weitere Marker zur Definition von im Zervixkarzinom enthaltenen Tumorarealen zur Verfügung [192]. Der Nachweis von Ki67 stellt eine etablierte Methode dar, stark proliferierendes Gewebe aufzuzeigen. Der Tumorsuppressor p16 ist ein auch in Routinefärbungen eingesetzter Marker für die diagnostische Abklärung von Zervixpathologien. Beide Proteine wurden für die Detektion von Tumorinseln in Gefrierschnitten des CxCa eingesetzt. Dafür wurde auf eine zusätzliche HE-Färbung verzichtet. Negativkontrollen erfolgten äquivalent zu FFPET. Ein Vergleich zwischen normalem Zervixepithel und Kanzerosen ist in Abbildung 4.14 zu sehen.

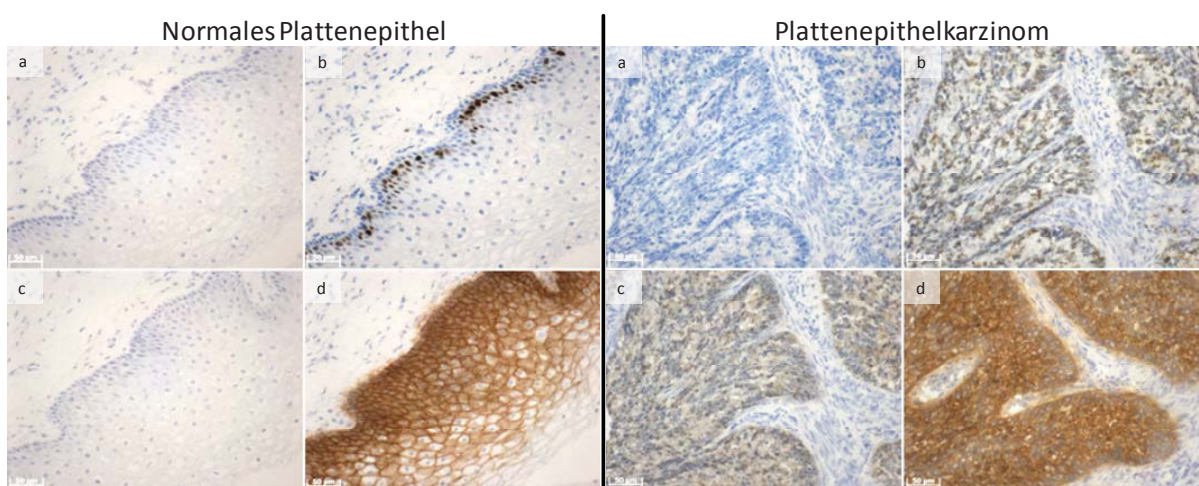


Abbildung 4.14 Immunhistochemie von Gefriergewebe der Zervix. Neben einer Färbung von CAR (d; Klon RmcB) erfolgte eine Markierung mit Ki67 (b), p16 (c) und die Mitführung einer Negativkontrolle (a; ohne Primärantikörper). Dargestellt sind identische Areale normalen mehrschichtigen Plattenepithels der Zervix (links) und Tumorinseln (rechts; 10 x 20-fache Vergrößerung).

Im linken Teil von Abbildung 4.14 findet sich ein Plattenepithel der Zervix ohne jedwede kanzerogene Veränderung. Wie erwartet generierten weder die Negativkontrolle (a) noch die Färbung für p16 (c) ein Signal. Anhand der Markierung von Ki67 konnte die proliferativ aktive Parabasalzellschicht jedoch eindeutig lokalisiert werden. Weder die sich differenzierende Intermediärschicht noch die Superfizialschicht ließen proliferierende Zellen erkennen. Allein die Färbung für CAR (d) resultierte in einer starken Markierung des gesamten Epithels. Die nach außen zunehmende Auflockerung der Zellen täuschte eine leichte Signalabschwächung vor. Auf der rechten Seite der Abbildung findet sich beispielhaft ein Ausschnitt zweier Tumorinseln. Neben der ungefärbten Negativkontrolle erzeugten alle verwendeten Antikörper eine Markierung. Sowohl die deutliche p16-Kern-Färbung (c) als auch die zahlreichen Signale für Ki67 (b) sprachen für durch HPV Infektion entartetes, stark proliferierendes Gewebe. Eine ebenfalls kräftige Färbung für CAR (d) belegte das Vorhandensein deutlicher Mengen des Vollängentranskripts in diesem Areal.

Formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe - Immunoscore

Nach Auswertung aller Färbungen der in Paraffin eingebetteten Zervixkarzinome mittels oben eingeführtem Immunoscore zeigte sich, dass zwischen nodalnegativen und nodalpositiven Tumoren kaum Unterschiede in der aufsummierten Proteinexpression aller CAR Isoformen bestehen (Tabelle 3).

Tabelle 3 Immunoscore der CAR-Expression im CxCa und korrelierenden Lymphknoten in Abhängigkeit von Nodalstatus - FFPET. [-] negativ; (+) schwach positiv; (++) mäßig positiv; (+++) stark positiv, PT - Primärtumor

Formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe					
Intensität	n (N0)	% N0	n (N1)	% N1	Lymphknotenstaus PT
-	4	44	3	25	(+) (+) (+)
+	4	44	7	58	(-) (+) (++) (++) (++) (++) (n.a.)
++	1	11	2	17	(++) (++)
+++	0	0	0	0	0

Mit der Ausbildung von Lymphknotenmetastasen verschoben sich die Prozentwerte leicht und mäßig CAR-positiver Tumore etwas nach oben (+ 14 % und + 6 %). Dies korrelierte mit den mRNA-Daten für CAR4/6 und CAR6/7, welche im Zusammenhang mit der Metastasierung ebenfalls einen Anstieg der CAR-Expression belegten (siehe Abbildung 4.11). Der Anteil CAR-negativer Tumore sank von 44 % auf 25 %. Eine statistische Auswertung ergab jedoch - auch aufgrund der geringen Fallzahlen - keine Signifikanz. Die Farbeintensitäten der jeweils zu entsprechendem N1-Primärtumor gehörenden Lymphknotenmetastase korrelierten nur bedingt mit dem Immunoscore des Tumors. Es zeigten sich sowohl CAR-positive Metastasen bei negativem Primärtumor als auch CAR-negative Metastasen im Zusammenhang mit schwach positiven Tumoren.

Gefriergewebe - Immunoscore

Da der Ursprung oben beschriebener RNA-Analysen in Gefriergewebe lag, wurde dieses parallel zu FFPET unter identischen Gesichtspunkten und mittels auf RmcB angepasstem Immunoscore analysiert. Die Verwendung von RmcB als Anti-CAR6/7 Antikörper erlaubte es, Rückschlüsse auf die Expression dieser einzelnen Isoform zu ziehen und die Resultate in Zusammenhang mit den mRNA-Daten zu betrachten. Durch erschwerte Zugänglichkeit zu aufeinander abgestimmten Tumor - Lymphknotenpaaren war es nicht möglich, zu den entsprechenden N1-Primärtumoren passenden Metastasen immunhistochemisch zu untersuchen. Der direkte Vergleich N0 zu N1 ergab auch in der Expression des Vollängentranskripts keine Unterschiede (Tabelle 4).

Tabelle 4 Immunoscore der CAR-Expression im CxCa in Abhängigkeit vom Nodalstatus - Gefriergewebe
[(-) negativ; (+) schwach positiv; (++) mäßig positiv; (+++) stark positiv]

Gefriergewebe				
Intensität	n (N0)	% N0	n (N1)	% N1
-	0	0	0	0
+	0	0	1	8
++	4	40	4	33
+++	6	60	7	58

Die Prozentwerte fallen entgegen den Erwartungen um 7 % und 2 % bei mäßig und stark CAR-positiven Tumoren. Ein Tumor mit schwacher Expression von CAR6/7 tritt nur in der Gruppe der nodalpositiven Fälle auf. Die Schwankungen innerhalb der Prozentangaben sind sehr wahrscheinlich auf die geringe Fallzahl zurück zu führen und haben nur wenig Gewicht. Eine statistische Auswertung ergab daher auch an dieser Stelle keine signifikanten Verschiebungen. Der Anstieg der CAR6/7-mRNA-Mittelwerte mit Ausbildung von Lymphknotenmetastasen (siehe Abbildung 4.11) konnte anhand der IHC-Daten nicht bestätigt werden.

Eine, sich an diese Experimente anschließende, Erhöhung der generellen Fallzahl immunhistochemisch untersuchter Gewebe erschien aufgrund der recht homogenen und wenig aussagenden Daten nicht sinnvoll. Die zusätzlich durchgeführte Aufschlüsselung nach FIGO-Stadien ergab - auch aufgrund der geringen Fallzahlen - keinerlei weitere Erkenntnisse und wurde hier nicht weiter diskutiert. Ganz allgemein verdeutlichen die gezeigten Ergebnisse, dass sich die Quantifizierung eines Proteins mittels immunhistochemischer Methoden teilweise schwierig gestalten kann und immer einer gewissen Subjektivität unterliegt. Eine Korrelation mit der Expression auf mRNA-Ebene muss nicht zwingend nachweisbar sein, da vor allem geringe Unterschiede über Bestimmung von Signalintensitäten nur schlecht voneinander abzugrenzen sind. Im weiteren Verlauf dieser

Arbeit wurde daher den quantitativen RNA-Analysen im Vergleich zu den bestenfalls semiquantitativen IHC-Daten wesentlich mehr Gewicht beigemessen. Schlussendlich konnte die Expression von CAR in nahezu jedem Tumor auch auf Proteinebene bestätigt werden.

4.3. Funktionelle Eigenschaften der membranständigen Rezeptorisoformen

Zur Charakterisierung funktioneller Eigenschaften des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors auf Proteinebene bedurfte es der Translation von CAR4/6 und CAR6/7. Daher erfolgte auf Basis der TOPO-pCR4-Konstrukte die Umklonierung beider CAR-Isoformen in eine modifizierte Variante des Expressionsvektor pBK-CMV. In diesem wird die eukaryotische Expression durch den frühen Promotor des Cytomegalievirus (CMV) angetrieben. Das Vorhandensein eines Neomycin-Resistenzgens unter Kontrolle des SV40-Promotors ermöglichte eine spätere G418-Selektion stabil transfizierter Zellklone.

4.3.1. Transfektionseffizienzen und Zellvitalität

Die Bestimmung der Effizienz einer durchgeführten Transfektion erforderte ein möglichst einfaches Testsystem. Als schnelles und unkompliziertes Modell erwies sich hierbei die Expression von EGFP. Nur erfolgreich EGFP-transfizierte Zellen exprimierten auch das entsprechende Protein und zeigten nach Anregung bei 395 nm eine grüne Fluoreszenz. Abbildung 4.15 zeigt stellvertretend für HeLa und HT1080 Beispiele für eine niedrige und eine hohe Transfektionseffizienz.

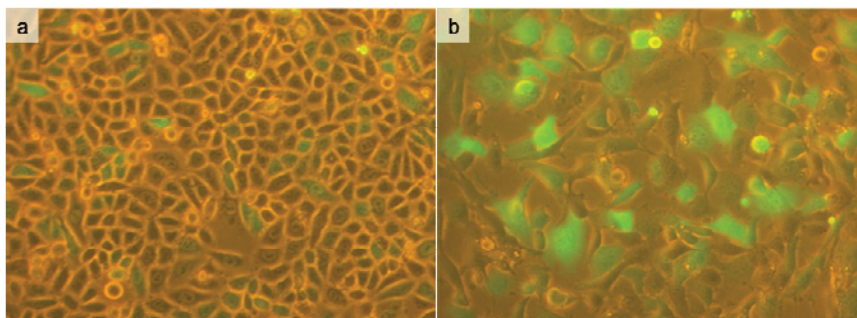


Abbildung 4.15 Transfektion von EGFP-pBK-CMV-Konstrukten in HeLa und HT1080. (a) Trotz zahlreicher Varianten der Transfektion zeigte HeLa immer nur einen geringen Prozentsatz EGFP-positiver Zellen (grün). (b) Im Gegenzug exprimierten HT1080-Kulturen nach Transfektion von EGFP regelmäßig große Mengen des Proteins in zahlreichen Zellen (Vergrößerung 10 x 10-fach plus maximaler digitaler Zoom der Kamera)

Während HeLa trotz unterschiedlicher Mengen einzubringender DNA und variierender Inkubationszeiten regelmäßig nur mit niedrigen Effizienzen von etwa 10 - 20 % transfiziert werden konnte (a), lag der Prozentsatz EGFP-positiver HT1080-Zellen im Normalfall bei 80 - 90 % (b). Die drei im weiteren Verlauf zusätzlich verwendeten Zelllinien SW756, MDA_MB435S und NIH3T3 ließen sich mit jeweils 10 - 20 %, 40 - 50 % und 30 - 40 % schwach bis mäßig effizient transfizieren. Alle im Anschluss durchgeführten funktionellen

Analysen basierten aufgrund dieser eher niedrigen Transfektionseffizienzen transienter Kulturen allein auf G418-selektierten stabilen Zellklonen. Parallel zur Effizienzbestimmung erfolgte über DAPI-Färbung eine Analyse der Kernmorphologie. So konnte ausgeschlossen werden, dass weder die Transfektionsreaktion an sich, noch die Expression von CAR einen Apoptose induzierenden Effekt aufweisen. Abbildung 4.16 zeigt einen repräsentativen Ausschnitt DAPI-markierter nativer und transfizierter HT1080-Zellen.

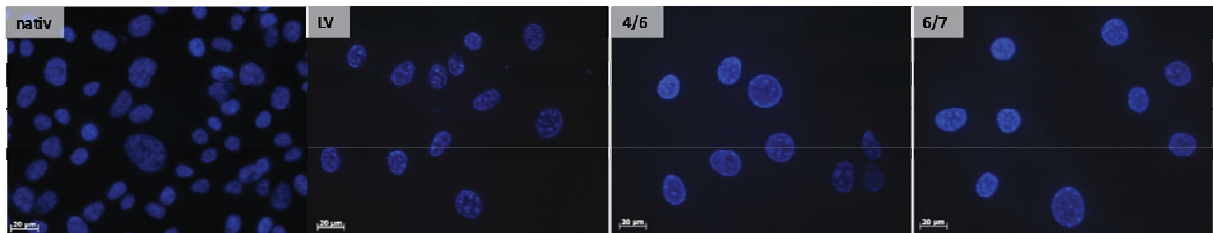


Abbildung 4.16 DAPI-Färbung nativer und mit pBK-CMV-Konstrukten transfizierter HT1080-Zellen. Weder die Transfektionsreaktion an sich (Leervektor, LV), noch das Einbringen einer der beiden CAR-Isoformen (4/6 und 6/7) bewirkten eine Induktion der Apoptose. Über 95 % der Kerne verfügten über eine einheitliche Morphologie. Die Zelldichte bei Transfektion wurde absichtlich etwas niedriger gewählt, um Apoptose-Induktion durch zu hohe Konfluenz der Kultur zu umgehen (10 x 40-fache Vergrößerung).

Neben einem kleinen Anteil mitotischer Zellen mit kondensiertem Chromatin wiesen über 95 % der Kerne eine gleichmäßige Struktur und homogene Färbung auf. Apoptotische Veränderungen wie verkleinerte, dichter gepackte oder zerfallene Zellkerne waren in keiner der Kulturen überdurchschnittlich häufig zu finden.

4.3.2. Expressionsraten von CAR4/6 und CAR6/7 in transfizierten Zellen

Der Großteil funktioneller Analysen basierte auf den beiden Zervixkarzinomkulturen HeLa und SW756 sowie den CAR-negativen Zelllinien HT1080 und MDA_MB435S. Um sicher zu stellen, dass diese Zellen nach Transfektion und Selektion CAR auch wirklich exprimieren, erfolgten an dieser Stelle sowohl Untersuchungen auf RNA- als auch auf Proteinebene. Die Ergebnisse der RNA-Analysen sind in Abbildung 4.17 zu sehen. Alle vier Zelllinien zeigten bezüglich endogener CAR4/6-Expression keine oder nur sehr schwache Signale (linke Spalte, a). Nach stabiler Transfektion von CAR4/6 stiegen die RNA-Level in jedem Falle in einen gut messbaren bis hohen Bereich (b). Ähnlich stellten sich auch die Ergebnisse für CAR6/7 dar (rechte Spalte). Eine recht schwache endogene Expression (a) konnte durch stabiles Einbringen der Plasmid-DNA meist deutlich angehoben werden (b). Einzig HeLa erwies sich als etwas schwieriger. Die Überexpression von CAR6/7 resultierte in einer nur wenig über dem endogenen Expressionslevel liegenden CAR6/7-RNA-Expression.

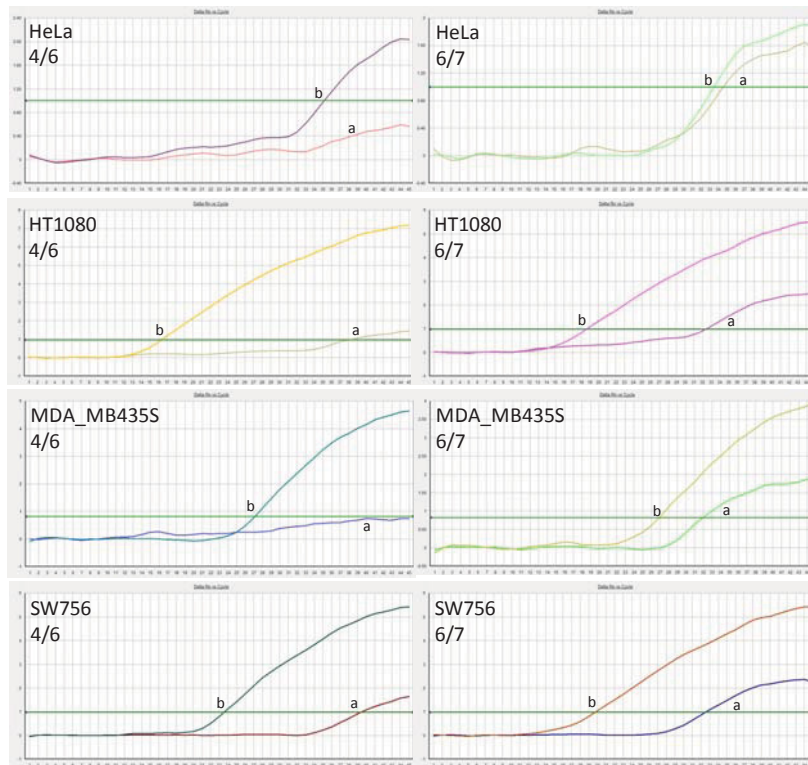


Abbildung 4.17 CAR-mRNA-Expression in Zelllinien. Endogene (a) und ektopische (b) Expression von CAR4/6 (linke Spalte) und CAR6/7 (rechte Spalte) in stabil transfizierten HeLa, HT1080, MDA_MB435S und SW657 Zellen. Beide Isoformen zeigten eine nicht nachweisbare bis schwache endogene Expression. In der Mehrheit der Fälle resultierte eine Überexpression in signifikant erhöhten CAR-mRNA-Spiegeln. Einzig CAR6/7-transfizierte HeLa wiesen nur einen leichten Anstieg der CAR6/7-Expression auf.

Inwieweit sich diese CAR-Überexpression auch auf translationaler Ebene auswirkt, sollte in anschließenden immunzytochemischen Färbungen überprüft werden (Abbildung 4.18).

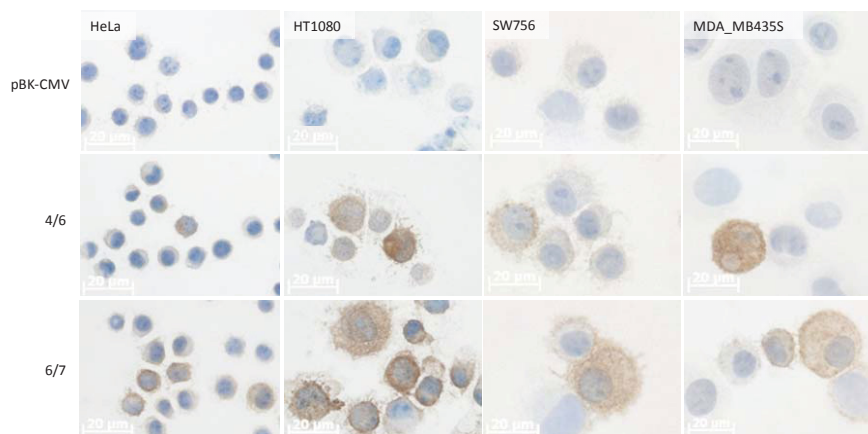


Abbildung 4.18 Expression von CAR in stabil transfizierten Zelllinien. Die obere Zeile zeigt stabil mit Leervektor transfizierte CAR-negative Zellen. Mittig dargestellt sind Kulturen nach CAR4/6-Transfektion. Proteinexpression ist in einem Teil der Zellen deutlich nachzuweisen. Im unteren Teil findet sich die Markierung CAR6/7-transfizierter Zellen. Auch hier ist ein eindeutig CAR-positives Zellkollektiv auszumachen. Färbungen erfolgten mit H300 als Parallelmarker für alle CAR-Isoformen (Ausschnitte aus Bildern mit 10 x 40-facher Vergrößerung).

Alle vier Zelllinien zeigten nach Transfektion mit Leervektor auf immunzytochemischer Ebene keine CAR-Signale (obere Zeile). Die endogene Expression scheint zu schwach für den Nachweis auf Proteinebene. Im Vergleich dazu ließen sich einige der stabil CAR4/6-transfizierten Zellen mäßig bis stark anfärben (mittlere Zeile). Der Prozentsatz positiv selektionierter Zellen lag mit durchschnittlich 10 - 20 % jedoch weit unter den Erwartungen. Einzig HT1080 zeigte mit ca. 50 % einen höheren Anteil Markierungen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für CAR6/7-exprimierende Kulturen erzielt (untere Zeile). Mit durchschnittlich 30 - 40 % lag die Anzahl positiver Zellen etwas höher. Auch hier erwies sich HT1080 als Linie mit dem höchsten Prozentsatz CAR-positiver Zellen. Mögliche durch CAR verursachte funktionelle Effekte sollten sich daher in dieser Kultur am deutlichsten zeigen. Ob die geringen CAR-Expressionsraten in den verbleibenden Zelllinien auch ausreichen, um funktionelle Veränderungen zu bewirken, wurde im weiteren Verlauf untersucht.

4.3.3. Western Blot

Da bei Verwendung des polyklonalen Anti-CAR H300 Antikörpers mehrere CAR-Isoformen erkannt werden und keine Aussagen über die Größen der nachgewiesenen Proteine getroffen werden können, erfolgte mittels Western Blot ein alternativer Nachweis erfolgreicher CAR-Translation. So konnte die Expression einer verkürzten Variante des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors auch auf Proteinebene eindeutig bestätigt werden. Abbildung 4.19 zeigt den mit stabil transfizierten HT1080-Zellen durchgeführten Blot.

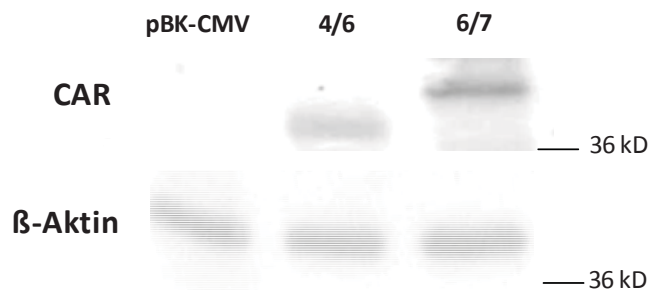


Abbildung 4.19 Western Blot von mit pBK-CMV-Konstrukten stabil transfizierten HT1080-Zellen. Proteinlysate aus $1,5 \times 10^4$ Zellen wurde über ein 10 %-iges Acrylamidgel aufgetrennt und mittels Anti-CAR H300 visualisiert. Während die Expression von CAR6/7 in einem Proteinsignal bei 46 kD resultierte, generierte die Kontrolltransfektion mit pBK-CMV kein nachweisbares Signal. CAR4/6-transfizierte Zellen exprimierten ein etwa 6-7 kD kleineres Produkt. β-Aktin (43 kD) diente als Kontrolle einer homogenen Gelbeladung.

Wie bereits durch Immunmarkierung gezeigt generierten mit Leervektor transfizierte HT1080-Zellen auch hier kein nachweisbares CAR-Signal. Es zeigte sich jedoch sowohl für CAR4/6 als auch CAR6/7 ein spezifisches Produkt. Größentechnisch wiesen diese Proteine eine Differenz von ca. 6 - 7 kD auf. Auf der Höhe von etwa 46 kD fand sich in CAR6/7-transfizierten Kulturen einzig das vollständige Protein. Dessen Molekulargewicht setzt sich

aus dem eigentlichen Proteingewicht von 40 kD und zusätzlichen 6 kD resultierend aus der Glykosylierung zweier Asparagine zusammen [74]. Mit knapp 40 kD entspräche die Bande bei CAR4/6-transfizierten Kulturen der theoretischen Berechnung zu dessen Proteingröße. Basierend auf der Translation von 975 Nukleotiden entstünde abzüglich Stoppcodon ein 324 Aminosäuren umfassendes Produkt von etwa 35,6 kD. Durch Verlust einer von Exon 5 kodierten Glykosylierungsstelle und unter Annahme der Glykosylierung des zweiten Asparagin N106 in der D1-Domäne mit etwa 3 kD resultiert das Gesamtproteingewicht in ca. 38,6 kD. In etwa auf dieser Höhe konnte das entsprechende Produkt auch detektiert werden. Diese Daten bestätigen oben gezeigte Immunmarkierungen und belegen anhand der Proteingröße eindeutig eine effektive CAR4/6-Translation in den Zellen.

4.3.4. Lokalisation und Antikörperspezifität

Da oben durchgeführte Immunmarkierungen ebenfalls nicht eindeutig erkennen ließen, wo innerhalb der Zelle CAR4/6 lokalisiert ist, bestand der nächste Schritt in konfokaler Laserscanmikroskopie (LSM) transfizierter und fluoreszenzmarkierter HT1080-Zellen. Diese Methode erzielt eine wesentlich bessere axiale Auflösung als konventionelle Weitfeldmikroskopie und ermöglicht eine eindeutige Abgrenzung zwischen membranständigen und zytoplasmatischen Proteinen. Aufgrund der bereits beschriebenen Lokalisation von CAR6/7 in der Zellmembran und einer theoretischen Betrachtung der CAR4/6-Proteinstruktur wurde auch für diese Isoform eine membranständige Lokalisation angenommen. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz finden sich in Abbildung 4.20.

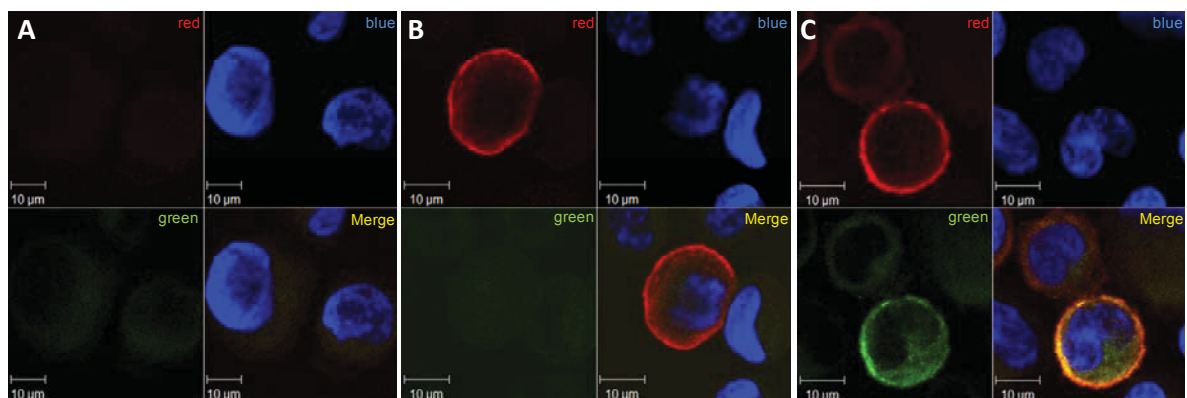


Abbildung 4.20 LSM-Immunfluoreszenz von HT1080-Zellen nach Expression von pBK-CMV-Konstrukten. Zellen wurden mit leerem pBK-CMV-Vektor (A), CAR4/6 (B) und Vollängen-CAR (C) transfiziert und parallel mit polyklonalem Anti-CAR H300 (roter Kanal) und monoklonalem Anti-CAR RmcB (grüner Kanal) angefärbt. Die Kernfärbung erfolgte mittels DAPI. Transfektionseffizienzen lagen im Mittel bei 50 - 80 %. Die ringförmige periphere Markierung ist bezeichnend für die membranständige Lokalisation beider Isoformen. A: Leervektor transfizierten Zellen zeigen keine Färbung. B: CAR4/6-exprimierende Zellen sind allein mit H300 anfärbbar. C: CAR6/7 positive Zellen werden von beiden Antikörpern erkannt und weisen eine Kolokalisation im Färbemuster auf. (10 x 63-fache Vergrößerung).

Die Färbung erfolgte unter Verwendung zweier verschiedener Antikörper. Während Anti-CAR RmcB einzig CAR6/7 erkennt (grüne Fluoreszenz), markiert Anti-CAR H300 beide Isoformen (rote Fluoreszenz). Mit Leervektor transfizierte HT1080-Zellen zeigten für keinen der beiden Antikörper ein Signal (A). Nach Transfektion mit CAR4/6 generierte H300 eine ringförmige Rotfluoreszenz (B). RmcB jedoch war nicht in der Lage, das Protein zu erkennen. Im Grünkanal konnte keine Markierung nachgewiesen werden. Das Einbringen von CAR6/7 resultierte schlussendlich in sich überlagernden ringförmigen Rot- und Grünsignalen (C). Das in diesen Zellen exprimierte Protein war somit durch beide Antikörper nachweisbar. Diese Bilder belegen eindeutig, dass in CAR4/6-transfizierten Zellen auch einzig diese Isoform exprimiert wird. Im Weiteren gezeigte funktionelle Effekte beruhen daher allein auf CAR4/6-Expression. Aufgrund des homologen Färbemusters wird ebenfalls deutlich, dass auch CAR4/6 membranständig lokalisiert ist. Änderungen der Zellmorphologie traten nicht auf.

4.3.5. Proliferation

Auf Basis oben gezeigter stabil CAR-exprimierender Kulturen erfolgte im ersten Schritt eine Analyse der proliferativen Kapazität. Dies geschah durch Bestimmung der metabolischen Aktivität nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation unter Annahme eines linearen Zusammenhangs zur Zellzahl. Um auszuschließen, dass die Expression von CAR selbst die metabolische Aktivität der Zellen beeinflussen kann und damit Ergebnisse verfälscht, wurden die Daten durch parallele Bestimmung der absoluten Zellzahl validiert (hier nicht zusätzlich dargestellt). In Abbildung 4.21 gezeigte Ergebnisse des MTT-Assays konnten auf diese Weise bestätigt werden.

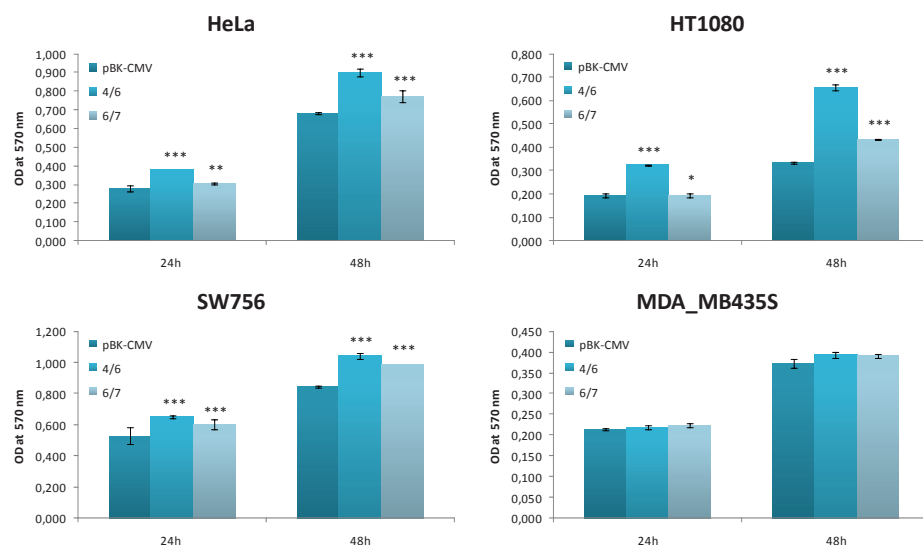


Abbildung 4.21 Proliferationsassay nach Transfektion von CAR4/6 und CAR6/7 in verschiedenen Zelllinien. MTT-Proliferationsassays wurden nach 24- und 48-stündiger Inkubation durchgeführt. Alle Versuche erfolgten im Triplikat. Sowohl CAR4/6 als auch CAR6/7 sind im Vergleich zum Leervektor pBK-CMV in der Lage, die Proliferation in HeLa, HT1080 und SW756 signifikant zu steigern. (***) $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; Mann-Whitney-U Test).

Verglichen wurden CAR4/6- und CAR6/7-exprimierende Zellen zu mit Leervektor transfizierten Kulturen. Die Abbildung zeigt die mittels MTT-Assay ermittelte metabolische Aktivität normalisiert auf MTT-Umsatz eine Stunde nach Zellaussaat. Eventuell auftretende Fehler bei der Einstellung der Zellzahl konnten so ausgeschlossen werden.

Eine ektopische Expression von CAR4/6 steigerte das Zellwachstum in HeLa, HT1080 und SW756 signifikant ($p < 0,001$). Die Proliferationsraten CAR4/6-positiver Zellen waren sowohl nach 24 h als auch nach 48 h am höchsten. Verglichen zum Leervektor resultierte bei 24-stündiger Inkubation auch CAR6/7-Expression in einem leichten Anstieg der Proliferation ($p < 0,05$). Nach Ausdehnung der Proliferationsdauer auf 48 h zeigte sich eine noch deutlichere Zunahme der Zellzahl im Vergleich zum Leervektor ($p < 0,001$). Einzig MDA_MB435S-Zellen wiesen nach CAR-Transfektion keine Änderungen ihrer proliferativen Eigenschaften auf.

4.3.6. *Migration und Invasion*

Im Hinblick auf mögliche Zusammenhänge zwischen CAR und Metastasierung erfolgten im nächsten Schritt Analysen des Migrations- und Invasionspotenzials CAR-positiver Zellen. Denn nur mobile und vor allem invasiv wachsende Zellen sind in der Lage, aus einem Tumorverband auszubrechen und sich über die Gefäße einen Weg ins Gewebe zu bahnen, um dort zu Metastasen auszuwachsen. Abbildung 4.22 verdeutlicht, inwieweit die Expression von CAR Einfluss auf diese Eigenschaften nehmen kann.

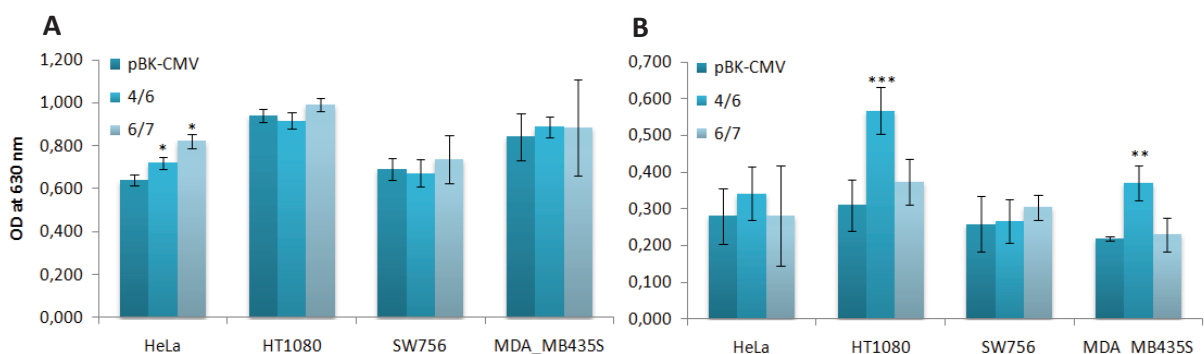


Abbildung 4.22 Migrations- und Invasionsassay nach Transfektion von CAR4/6 und CAR6/7 in verschiedene Zelllinien. Die Inkubationsdauer lag für HT1080 bei 7 h, für alle weiteren Zelllinien bei 24 h. Alle Versuche erfolgten im Triplikat und wurden bei OD 630 nm ausgewertet. A: Sowohl CAR4/6 als auch CAR6/7 sind im Vergleich zum Leervektor pBK-CMV in der Lage, die Migration in HeLa signifikant zu steigern. B: CAR4/6-Expression führt im Vergleich zu pBK-CMV zu einer signifikanten Steigerung der Invasivität bei HT1080 und MDA_MB435S. (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; Mann-Whitney-U Test).

Im linken Teil von Abbildung 4.22 finden sich Daten zum Migrationsverhalten stabil mit pBK-CMV-Konstrukten transfizierter Zellen (A). Ein Einfluss seitens CAR auf die Migration konnte nur in HeLa festgestellt werden. Hier führten sowohl die Überexpression von CAR4/6 als

auch CAR6/7 im Vergleich zum Leervektor zu einer signifikant erhöhten Mobilität der Zellen ($p < 0,05$). Weder HT1080 noch SW756 oder MDA_MB435S ließen sich durch CAR-Expression in ihrem Migrationsverhalten beeinflussen. Die rechte Seite der Grafik gibt Auskunft über die Invasivität CAR-transfizierter Zellen (B). Eine ektopische Expression von CAR4/6 steigerte das Invasionspotenzial von HT1080 und MDA_MB435S signifikant ($p < 0,001$). Beide Zelllinien sind per se in der Lage, Matrigel anzubauen und invasiv zu wachsen. Diese Fähigkeit wurde durch Überexpression von CAR4/6 wesentlich verstärkt. Das Einbringen von CAR6/7 resultierte nicht in Änderungen der Invasivität.

4.3.7. Adhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix

Der folgende Teil der Arbeit befasste sich mit der Fähigkeit CAR-exprimierender Zellen an Komponenten der extrazellulären Matrix zu binden. Basierend auf der Publikation von Patzke [43] wurde an dieser Stelle speziell auf die dort beschriebene Wechselwirkung zwischen der extrazellulären membranproximalen D2-Domäne und Fibronectin eingegangen. Die Überexpression des als Adhäsionsprotein beschriebenen CAR6/7 sollte zu einer verstärkten Anheftung der Zellen an diese Beschichtung führen. Andererseits wäre aufgrund des partiellen Verlusts der D2-Domäne eine mit CAR4/6-Expression einhergehende verringerte Adhäsion an Fibronectin denkbar. Daten hierzu sind in Abbildung 4.23 zusammen gefasst.

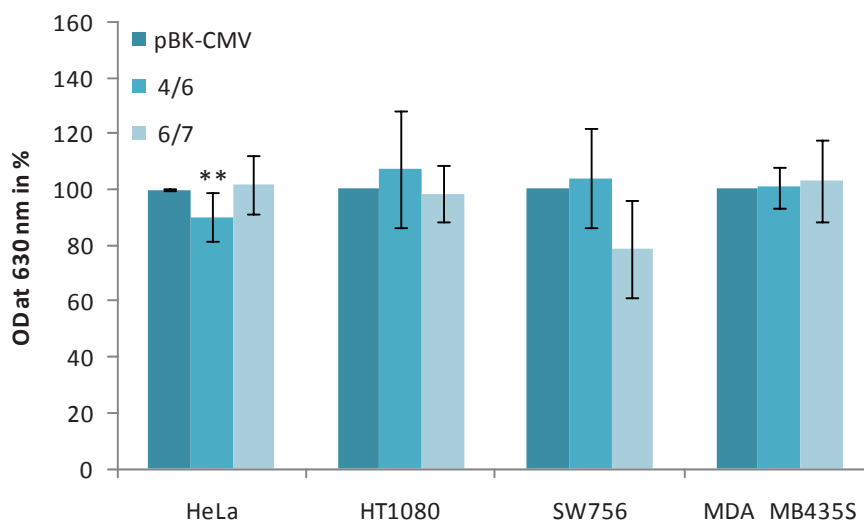


Abbildung 4.23 Adhäsion an Fibronectin nach Transfektion von CAR4/6 und CAR6/7 in verschiedenen Zelllinien. Nach 2-stündiger Adhäsion an Fibronectin- bzw. BSA-beschichtete Oberflächen erfolgte die Auswertung der Assays unter Normalisierung der Fibronectindaten auf die BSA-Werte. Alle Versuche erfolgten mindestens im Triplikat. Einzig HeLa zeigte nach Expression von CAR4/6 eine leichte, aber signifikante Reduktion der Adhäsivität. (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; Mann-Whitney-U Test).

Von allen untersuchten Konstrukten und Zelllinien bewirkte im Vergleich zu mit Leervektor transfizierten Zellen allein CAR4/6-Expression in HeLa eine signifikante Reduktion der Adhäsion an Fibronektin. Die ebenfalls deutlich geringere Zahl adhärenter CAR6/7-exprimierender SW756-Zellen wies aufgrund hoher Standardabweichungen keine Signifikanz auf. Weder in HT1080 noch in MDA_MB435S resultierte die Überexpression von CAR in einer Änderung des Adhäsionsverhaltens.

Die Komplexität der extrazellulären Matrix bedingt, dass neben Fibronektin noch zahlreiche andere Bestandteile mit CAR interagieren könnten. Mit den Kollagenen vom Typ I und III sowie dem Glykoprotein Laminin B1 wurden im weiteren Verlauf drei dieser Hauptbestandteile auf ihre Wechselwirkungen mit CAR-exprimierenden HT1080-Zellen hin überprüft. Daten hierzu finden sich in Abbildung 4.24.

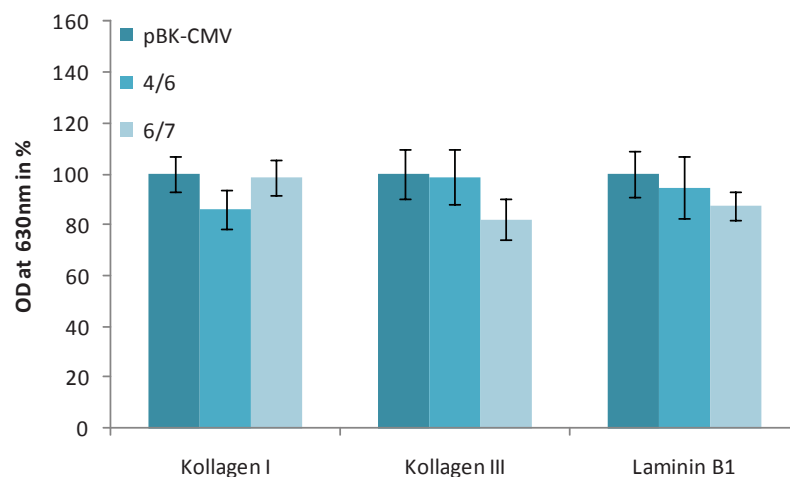


Abbildung 4.24 Adhäsionsassay nach Transfektion von CAR4/6 und CAR6/7 in HT1080-Zellen. Nach 2-stündiger Adhäsion an Kollagen I-, Kollagen III- und Laminin B1- bzw. BSA-beschichtete Oberflächen erfolgte die Auswertung der Assays unter Normalisierung auf die BSA-Werte. Alle Versuche erfolgten mindestens im Triplikat. Keine Beschichtung führte zu einer signifikanten Änderung des Adhäsionsverhaltens der Zellen.

Für keine der drei Beschichtungen konnte eine signifikante Veränderung des Adhäsionsverhaltens nach Expression einer der beiden membranständigen CAR-Isoformen festgestellt werden.

4.3.8. Ankerungsunabhängiges Wachstum im Weichagar

Schlussendlich erfordert die Ausbildung von Metastasen aus einzelnen Tumorzellen auch immer deren Fähigkeit, ankerungsunabhängig zu einer Kolonie auszuwachsen. Mit einem Softagartest stand uns hierfür eine bereits gut etablierte Methode zur Verfügung. Die Anwendung dieser erforderte jedoch erneutes Umklonieren in pLXSP-Vektoren und Transfektion von NIH3T3-Zellen, da weder etablierte pBK-CMV-Konstrukte noch bereits

selektionierte Zelllinien reproduzierbare Ergebnisse generierten. Für dieses Modellsystem bildete HPV16 E7 eine gut etablierte Positivkontrolle [193]. Zum Einsatz kamen sowohl transient transfizierte Kulturen als auch 12 Tage selektierte Zellen. Die Auswertung der nach 14-tägiger Kultivierung ausgewachsenen Kolonien ist in Abbildung 4.25 zu sehen.

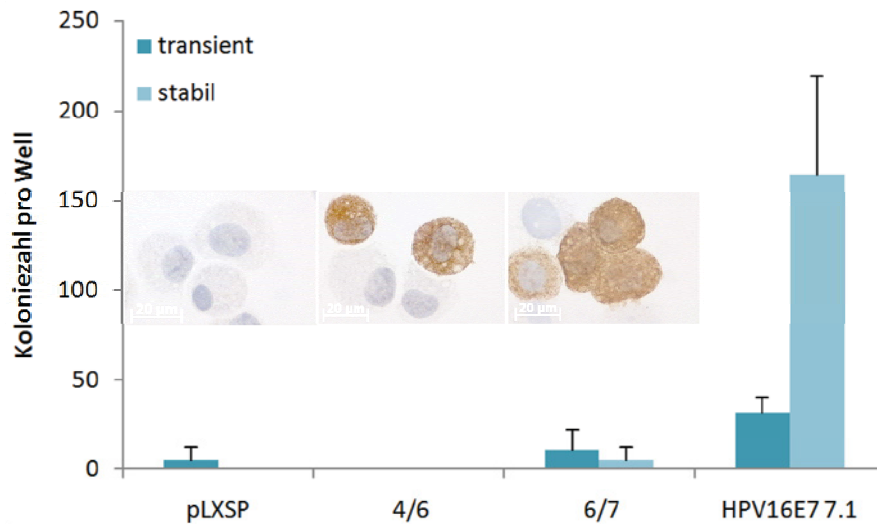


Abbildung 4.25 Ankerungsunabhängiges Wachstum transfizierter NIH3T3-Zellen in Weichagar. Im Gegensatz zum Wachstum zahlreicher HPV16E7-positiver Kolonien befähigt CAR-Expression nicht zu ankerungsunabhängigem Wachstum im Weichagar. Eingefügte ICC-Abbildungen belegen die Existenz der CAR-Protein-Expression in selektierten Kulturen (10 x 40-fach vergrößert).

Die Positivkontrolle HPV16 E7 zeigte bereits nach transienter Transfektion ein deutliches Koloniewachstum. Durch den Einsatz selektierter Kulturen konnte jenes noch um ein Vielfaches erhöht werden. Dies spricht dafür, dass durch Selektion die Anzahl HPV16E7-positiver Klone deutlich zunahm. Im Gegenzug fanden sich bei der Negativkontrolle - NIH3T3 transfiziert mit Leervektor pLXSP - wie erwartet keine oder nur sehr geringe Anzahlen ausgewachsener Zellen. Koloniezahlen in dieser Größenordnung wurden im weiteren Verlauf als „Hintergrundrauschen“ behandelt. Eben solches trat für CAR6/7-exprimierende Linien vor wie nach Selektion auf. CAR4/6-positive NIH3T3-Zellen erzeugten sogar in beiden Fällen keine einzige Kolonie. Im Rückschluss bedeutet dies, dass CAR-Expression allein die Zellen nicht dazu befähigt, ohne Ankerungspunkte im Gewebe zu proliferieren. Inwieweit CAR in Kombination mit anderen Faktoren potenziell dazu in der Lage wäre, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

5. Diskussion

5.1. CAR4/6 im Normalgewebe - funktionelle Relevanz

Prozesse des alternativen Spleißens werden im Organismus auf vielfältige Weise reguliert und bestimmen häufig das Schicksal einer Zelle. Sowohl zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimierte Isoformen eines Proteins als auch die wechselnde Kombination aus mehreren Spleißvarianten spielen dabei eine entscheidende Rolle. Ein gutes Beispiel hierfür ist die Expression von DSCAM (Down's syndrom cell adhesion molecule) im Prozess neuronaler Differenzierung. In *Drosophila* beeinflussen Spleißvarianten dieses Zelladhäsionsproteins aus der Ig-Familie maßgeblich die Verzweigung der Dendriten sowie die axonale Orientierung [194]. Im humanen DSCAM weisen Sequenzen ebenfalls auf putative alternative Spleißpositionen hin, Northern Blots zeigen variierende mRNA-Expressionslevel unterschiedlich großer Transkripte in verschiedenen Strukturen des adulten Gehirns [195]. Auch humanes DSCAM scheint daher in die neuronale Differenzierung involviert zu sein.

Auch CAR unterliegt alternativen Spleißprozessen in zahlreichen Geweben. So wurden bis heute für Herz, Hirn, Plazenta, Lunge, Leber, Niere, Bauchspeicheldrüse, Ovar und Brustdrüse unterschiedliche Kombinationen löslicher CAR-Varianten beschrieben [89-91]. Zusätzliche Belege für die Existenz alternativ gespleißter Isoformen lieferte auch diese Arbeit, welche mittels eines cDNA-Arrays die Präsenz von CAR4/6 in mehreren Normalgeweben bestätigt. Neben einer nahezu ubiquitären Expression des Vollängentranskripts, die vorangegangene mRNA-Analysen validiert, fand sich in 13 der 48 Gewebe eine Expression des endogenen CAR4/6-Transkripts. Da diese Gewebe sowohl ektodermalen (z.B. Haut), mesodermalen (z.B. Niere, Milz und Hohlvene) als auch endodermalen (z.B. Bronchien, Schilddrüse und Harnleiter) Ursprungs sind, scheint kein elementarer Zusammenhang zwischen CAR4/6-Expression und Keimblattursprung des entsprechenden Gewebes zu bestehen. Aufgrund der Diversität und funktionellen Vielfalt CAR4/6-positiver Gewebe ist eine gewebeübergreifende Korrelation auf funktioneller Ebene ebenfalls wenig wahrscheinlich. Daher erfolgt im weiteren Verlauf die Betrachtung möglicher Gründe für die Präsenz von CAR4/6-mRNA in ausgewählten Geweben/Gewebekollektiven des Arrays. In Anlehnung an CAR6/7 werden denkbare Funktionen der neuen Isoform diskutiert.

Mit Lymphknoten und Leukozyten sowie Knochenmark, Thymus, Milz und Mandeln umfasste der cDNA-Array die wichtigen Bestandteile des Abwehrsystems eines Organismus. Doch obwohl CAR bereits mit Entzündungsprozessen in Verbindung gebracht wurde [106-107], scheint diesbezüglich die Funktion des Rezeptors stark begrenzt. Denn während Knochenmark und Milz beide Varianten exprimieren, findet sich in Lymphknoten und

Leukozyten weder CAR4/6- noch CAR6/7-mRNA in detektierbaren Mengen. Dies legt nahe, dass CAR sich weniger an der Aktivität des lymphatischen System/Immunsystem beteiligt, sondern eher Differenzierung und Reifung anderer Blutbestandteile beeinflusst. Während daher an dieser Stelle sowohl für Vorläufer- als auch ausdifferenzierte Zellen der lymphoiden Linie die Abwesenheit von CAR postuliert wird, beteiligen sich Isoformen dieses Proteins möglicherweise an der Regulation des Ausdifferenzierens myeloischer Vorläuferzellen. Diese These wird von Publikationen zur CAR-abhängigen Differenzierung neuronaler Stammzellen sowie zur Expression dieses viralen Rezeptors sowohl in Erythrozyten als auch in Thrombozyten gestützt [196-198]. Auf Basis der vorliegenden Publikationen und Arraydaten wird an dieser Stelle die Hypothese aufgestellt, dass die Anschaltung der CAR-Expression im Rahmen der Ausdifferenzierung von Megakaryoblasten/Erythroblasten-Vorläuferzellen (MEV) stattfinden könnte. Vorläufer wie Erythroblasten und Megakaryozyten sowie ausgereifte Erythrozyten und Thrombozyten könnten maßgeblich zur CAR-mRNA in Knochenmark und Milz beitragen. Wesentlich hierfür ist die Funktion des Knochenmarks als Ort der Hämatopoese und die Funktion der Milz als Thrombozytenspeicher und Filter bzw. Abbaustätte überalterter Erythrozyten. Da Thrombozyten im Prozess der zellulären Hämostase unter Verwendung von CAM-Proteinen aggregieren können [199], soll an dieser Stelle im Speziellen deren Genese und Funktion im Zusammenhang zur Expression von CAR4/6 diskutiert werden. Mögliche Ansatzpunkte für CAR4/6-vermittelte Funktionen finden sich sowohl auf der Ebene der Lokalisation von MEV als Stammzellpopulation in einer vaskulären Nische des Knochenmarks [200], der Abschnürung von Thrombozyten ins Blut als auch der eigentlichen Thrombozytenaggregation nach Aktivierung. Eine Stammzellnische ist definiert durch eine unterstützende Umgebung aus zellulären und azellulären Komponenten rund um eine Stammzellpopulation [201]. Dort finden sich sowohl bestimmte, von Nachbarzellen exprimierte Oberflächenmoleküle (meist CAMs wie Cadherin, Catenin, Integrin) und Matrixkomponenten (z.B. Fibronectin) als auch von umgebenden Zellen sezernierte Signalmoleküle. Zusammen genommen stabilisieren diese die Stammzellen, halten sie in räumlicher Nähe zu den Signalgebern und regulieren Stammzellproliferation, -differenzierung und -überleben. Eine Hauptkomponente dieser hier diskutierten, speziellen hämatopoetischen Nische ist Fibronectin, welches sowohl die Ausreifung erythroider Zellen hemmt, also auch - in Kombination mit anderen Faktoren - Proliferation und Reifung von Megakaryozyten-Vorläuferzellen stimuliert [201-202]. Da Fibronectin auch zu Interaktionen mit der D2-Domäne von CAR befähigt ist [43], fand die Hypothese einer reduzierten Interaktion zwischen Fibronectin und CAR4/6 bereits im Ergebnisteil dieser Arbeit Beachtung. Es zeigte sich nach CAR4/6-Überexpression im Modell zelllinienabhängig eine signifikant verringerte Adhäsion der Zellen an Fibronectin. Wenn diese Prozesse auf die *in vivo*-Situation von Vorläuferzellen übertragbar sind, dient das Anschalten alternativer

Spleißmechanismen und die Expression von CAR4/6 möglicherweise der Erleichterung des Ablösens reifer Megakaryozyten aus der umgebenden Nische. Auf *in vivo*-Ebene ebenfalls vorstellbar sind stimulierende Einflüsse seitens CAR4/6 auf die Proliferation von Vorläuferzellen oder die Erleichterung der Überwindung von Matrixbarrieren auf dem Weg der Zellen aus der Nische zum Zielort. Innerhalb dieser Arbeit durchgeführte funktionelle Analysen belegen eine CAR4/6-vermittelte Steigerung von Proliferation und Invasivität und stützen diese Hypothesen. Die Milz als weiteres Organ der Hämatopoese speichert überwiegend ausgereifte Thrombozyten [203], weist aber ebenfalls CAR4/6-Transkripte auf. Mit dem Verweis auf die Präsenz des Vollängentranskripts in Zellen der myeloischen Linie wird hier die Annahme getätigt, dass auch CAR4/6 in diesen Zellen generiert werden und die in Milzgewebe nachgewiesenen Transkripte Thrombo- und Erythrozyten basiert sein könnten [197-198]. Da Thrombozyten eine gewisse Menge mRNA enthalten und eingeschränkt in der Lage sind, daraus neue Proteine zu synthetisieren [204], kann auch von der Translation der CAR4/6-mRNA ausgegangen werden. Eine mögliche Einflussnahme des Proteins auf Adhäsionsprozesse der Plättchen untereinander oder zur Umgebung, deren Aktivierung durch extrazelluläre Signale oder auch auf den Phänotypwechsel durch Interaktion mit dem sich umlagernden Zytoskelett ist vorstellbar. Interaktionen mit anderen Bindungspartnern als CAR6/7 schaffen eventuell erst die Voraussetzung für spezifische Abläufe innerhalb dieses streng regulierten Systems.

Die Hypothese der regulierten CAR-Expression in diversen Stammzellnischen kann auch an andere CAR4/6-positive Gewebe wie Gehirn, Fett, Niere oder Haut adaptiert werden. So finden sich laut Literatur in der subventrikulären Zone, im Gyrus dentatus des Hippocampus und in der subkortikalen weißen Substanz des Gehirns ebenfalls nachweisbare Kollektive adulter Stammzellen und neuronaler Vorläuferzellen [205]. Fettgewebe beinhaltet Stammzellen mit eher mesenchymalem Phänotyp in einer perivaskularen Nische, Zellen der Nierentubuli zeigen nach Verletzung mesenchymale Charakteristika mit hohen Proliferationsraten, die ebenfalls auf mesenchymalen Stromastammzellen mit perivaskulärer Lokalisation basieren [206-207]. Keratinozytenstammzellen der Haut sitzen in Nischen der basalen Epidermis, in adulten Haarfollikeln und Talgdrüsen [208]. Sowohl Proliferation und Differenzierung dieser Zellen als auch das Ablösen von Vorläuferzellen aus der Nische mittels reduzierter Adhäsion und/oder verstärkter Matrixinvasion könnten durch die Präsenz von CAR4/6 beeinflussbar sein. Jedoch nicht in allen Geweben, für welche die Existenz einer Stammzellpopulation bereits beschrieben wurde, war CAR4/6 auch wirklich nachweisbar (z.B. Dünndarm, Leber, Bauchspeicheldrüse). Daher sollte an dieser Stelle von einer hoch spezifischen Funktion dieser Isoform in der Ausdifferenzierung oder Auswanderung von Zellen ausgegangen werden, die nur unter ganz bestimmten Voraussetzungen relevant ist. Inwieweit Interaktionen zwischen CAR4/6 und CAR6/7 erforderlich sind, ist unklar. Arbeiten

zur starken Expression von CAR in der Embryogenese haben nie zwischen beiden membranständigen Isoformen des Rezeptors unterschieden, belegen jedoch die Existenz von CAR in embryonalen Stammzellen [93, 95, 209]. Es ist daher denkbar, dass die Expression von CAR4/6 in frühen Stadien der Differenzierung embryonaler Stammzellen maßgeblich an Funktionen beteiligt ist, die aktuell eher CAR6/7 zugesprochen werden.

Neben der putativen Relevanz von CAR4/6 in Differenzierungsprozessen sind auch andere Ansätze zu Funktionen dieser trunkierten Isoform von CAR denkbar. Seine Präsenz im Gehirn kann, basierend auf Adhäsionsprozessen, auch zur Aufrechterhaltung oder selektiven Barriere der Blut-Hirn-Schranke (BHS) beitragen. Denn im Gegensatz zu peripherem Endothel außerhalb des Gehirns besitzen Endothelzellen der Hirnkapillaren im Normalfall keine Intrazellularspalten, sondern stehen mittels überdurchschnittlich vieler Tight Junctions in sehr engem Kontakt. Die passive parazelluläre Barriere der BHS beruht im Wesentlichen darauf. In TJ kann, neben zahlreichen Claudin-Isoformen, auch CAR partiell die epitheliale Passage von Ionen und Makromolekülen beeinflussen [99]. Aufgrund seiner verkürzten, möglicherweise zu andersartigen Interaktionen fähigen, extrazellulären Domäne sind CAR6/7-unabhängige Einflüsse auf den parazellulären Molekülfluss seitens CAR4/6 denkbar. Die Einzigartigkeit der BHS und die Expression von CAR4/6 im Gehirn lassen Spekulationen aufkommen, dass ein Zusammenhang bestehen könnte. Für diese Hypothese spricht auch das Fehlen eines CAR-Signals in der Hypophyse. Denn Areale wie Neurohypophyse oder Zirbeldrüse, die Hormone ins Blut sezernieren oder durch Peptidhormone angesprochen werden, generieren notwendigerweise keine BHS [210]. Die Diskrepanz zur CAR4/6-negativen Schädelarterie lässt sich mit deren Hauptfunktion als Blutzufuhr des Gehirns erklären. Diese Struktur trägt weder wesentlich zur BHS noch zum Stoffaustausch bei.

Auf eine mögliche Rolle von CAR4/6 im Prozess viraler Infektionen deutet ebenfalls dessen Expression im Gehirn, aber auch in Bronchien und im Herzbeutel. Mit Hauptaugenmerk auf die vor allem von Cocksackie-Typ B Viren (CVB) bevorzugt infizierten Bereiche (Gehirn, Atemwege und Herz) finden sich beeindruckende lokale Übereinstimmung [111]. So umgibt der Herzbeutel (CAR4/6-positiv) das häufig befallene Herz (CAR4/6-negativ), CAR4/6-positive Bronchien sind der häufig infizierten Lunge (CAR4/6-negativ) vorgelagert. Publikationen belegen, dass CAR4/7 als lösliche Isoform des Rezeptors CVB3 *in vitro* binden und die virale Infektion verhindern kann [66]. Da CAR4/6 eine identische extrazelluläre Domäne besitzt, ist die Annahme gerechtfertigt, dass Viren auch mit der neuen membranständigen Variant von CAR interagieren können. Daher wird die Hypothese aufgestellt, dass die verkürzte extrazelluläre Domäne die viralen Partikel zwar binden kann, aber keine Infektion vermittelt. Ein vorstellbarer Ansatzpunkt ist eine fehlende Induktion der

Endozytose aufgrund struktureller Varianz zu CAR6/7. Belege hierfür liefert eine 2009 publizierte Arbeit um die Gruppe von Marchant, die zeigt, dass ohne CAR-vermittelte Aktivierung von ERK die Viren zwar gebunden, aber nicht internalisiert werden [211]. Das würde bedeuten, CAR4/6 wird in räumlicher Nähe der für CVB-Infektionen prädisponierten Gewebe hoch reguliert, fängt die Viren aus dem Blut- oder Luftstrom ab und stabilisiert sie an der Zelloberfläche. Damit verhindert das trunkierte Protein deren Bindung durch CAR6/7 und somit auch eine Infektion. CAR4/6 käme somit die Bedeutung eines Wächters zu, der sowohl am Eingang der Atemwege (Bronchien), an der BHS (Gehirn) als auch am Eingang (Hohlvene) und der direkten Umgebung des Herzens (Perikard) verstärkt exprimiert wird, um zirkulierende Viren zu sequestrieren. Auf diese Weise könnten anderenfalls noch häufiger infizierte Gewebe partiell vor einer Infektion geschützt werden. An dieser Stelle wäre daher die Fragestellung sehr interessant, ob Infektionen von einem Verlust der CAR4/6-Expression begleitet werden. Es wäre natürlich andererseits ebenfalls denkbar, dass CAR4/6-Expression in definierten Geweben erst zu einer Positionierung bzw. Stabilisierung der infektiösen viralen Partikel führt und Infektionen in deren Umgebung vermittelt. Damit würden Herz, Gehirn und Lunge allein aufgrund ihrer räumlichen Nähe zu CAR4/6-positiven Geweben zu bevorzugten Zielen der Viren werden.

Alle untersuchten Kompartimente des Verdauungstraktes und alle gynäkologischen Gewebe enthielten keine nachweisbaren Mengen an CAR4/6-cDNA. Eine biologische Funktion von CAR4/6 scheint daher an dieser Stelle eher unwahrscheinlich. In dieser Arbeit zeigte sich anhand der Zervixkarzinogenese eine Anschaltung der Expression von CAR4/6 in Tumorstadien. Inwieweit das zur Tumorentstehung und -progression beitragen kann, wird im folgenden Kapitel besprochen. Ob eine veränderte Regulation der CAR-Expression die Entartung CAR4/6-negativer Normalgewebe fördert, muss an anderen Tumorentitäten gastrointestinalen und gynäkologischen Ursprungs untersucht werden.

Abschließend sollen noch einige generelle Schwachstellen des Arrays erwähnt werden. Der erste Aspekt betrifft die Komplexität der untersuchten Organe, die sich funktionell meist in verschiedenste Kompartimente unterteilen. Aus der Beschreibung des Arrays war nicht ersichtlich, welche Bestandteile der Organe bzw. Gewebe der cDNA-Synthese zugrunde lagen. Aus so komplexen Systemen sind Rückschlüsse auf die Funktion von CAR4/6 sehr schwierig und daher unter Vorbehalt zu betrachten. Eine bessere Differenzierung zwischen den einzelnen Organkomponenten wäre wünschenswert, ist allerdings in einem Übersichtsarray kaum zu gewährleisten. An dieser Stelle muss zu detaillierteren Arrays gewechselt werden. Zum Zweiten basierten die Untersuchungen auf sehr geringen cDNA-Ausgangsmengen (Herstellerangabe: 3 - 6 ng/Gewebe). Daraus resultiert, dass negative Ergebnisse nicht zwingend reale Expressionslevel widerspiegeln müssen. Könnten die

Produkte aufgrund von zu wenig Template nicht ausreichend amplifiziert werden, lagen die Signale möglicherweise unter der Nachweisgrenze und das entsprechende Gewebe wurde als CAR-negativ eingestuft. Eine Steigerung der Template-Ausgangsmengen würde zur Klärung dieser Fragestellung beitragen und vorangegangene Ergebnisse validieren. Innerhalb dieser Arbeit generierte Daten zur CAR-Expression im Zervixepithel bestätigten den Array bereits für dieses Gewebe.

Zusammenfassend kann man daher sagen, dass dieser Gewebearray seinen Zweck - den Nachweis von CAR4/6 als neue Isoform des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors in normalen Geweben - vollends erfüllt hat. CAR4/6 ist kein Artefakt immortalisierter Zelllinien, sondern scheint auch eine Rolle im Zusammenspiel der Zellen gesunder Organismen zu besitzen.

5.2. CAR4/6-Expression in immortalisierten Zellen und Tumoren der Zervix

Nach Aufdeckung der Existenz einer neuen Spleißvariante des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors und Validierung der CAR4/6-Expression anhand zahlreicher Normalgewebe, erfolgte im nächsten Schritt eine systematische Quantifizierung von CAR in immortalisierten Zelllinien. Hierbei generierten HaCaT (**H**uman **a**dult **l**ow **C**alcium **h**igh **T**emperature keratinocytes) das mit Abstand höchste Signal für CAR4/6 und bestätigten die ursprüngliche Wahl dieser Keratinozytenzelllinie als Quelle für CAR-cDNA. HaCaT-Zellen sind humanen Ursprungs, entstammen der Peripherie eines Melanoms, besitzen allerdings einen histologisch normalen, epithelialen Phänotyp [181]. Obwohl sie *in vitro* spontan transformiert sind, wurden sie als nicht tumorigen charakterisiert. Ihre Besonderheit besteht in dem Erhalt einer Ca^{2+} -abhängigen, terminalen Differenzierungsfähigkeit. Sie ähneln daher in der Summe ihrer Eigenschaften einer Stammzellpopulation und untermauern die im oberen Abschnitt postulierte These einer Funktion von CAR4/6 im Lebenszyklus nicht vollends ausdifferenzierter Vorläuferzellen [212]. Das im Normalgewebearray verzeichnete CAR4/6-Signal in Hautgewebe korreliert mit diesen Daten. Die Abhängigkeit zur Ca^{2+} -Konzentration deutet auch die Einflussnahme anderer Mitglieder der CAM-Familie, der Cadherine, an. 293-Zellen als ebenfalls deutlich CAR4/6-positives, nicht tumorigenes Zellkollektiv entstammen einer humanen, embryonalen Niere und wurden mittels Adenovirus 5-DNA transformiert. Unter der Annahme, dass ihre CAR4/6-Expression während der Kultivierung erhalten blieb, sind sie ebenfalls ein deutliches Indiz dafür, dass die neue Isoform des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors eine wesentliche Funktion in der Embryogenese innehat.

Da die Hauptfunktion von Fibroblasten weniger die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten, sondern eher die Synthese und Sezernierung von ECM-Komponenten ist, wurde in HT1080 als immortale Zellen eines Fibrosarkoms keine Expression von CAM-Komponenten erwartet. Analysen der CAR-mRNA Level bestätigten das. Daher dienten HT1080-Zellen als

bevorzugtes, humanes Modell für nahezu alle funktionellen Tests. Bezüglich eines Modellsystems für funktionelle Einflüsse ektopisch exprimierten CARs auf die Zervix fiel anhand der mRNA-Daten eine erste Entscheidung zwischen HeLa und SiHa. Neben geringen Mengen CAR6/7 fand sich in HeLa-cDNA ein mäßig starkes Signal für CAR4/6. SiHa als zweite zervikale Zelllinie generierte ein sehr schwaches CAR4/6-Signal, jedoch ein deutlich stärkeres für CAR6/7 als HeLa. Da im weiteren Verlauf sowohl CAR4/6- als auch CAR6/7-vermittelte Effekte analysiert werden sollten, fiel die finale Wahl auf HeLa. SW756 und MDA_MB435S wurden anhand ihrer schwachen immunhistochemischen Markierung für Gesamt-CAR in das Kollektiv aufgenommen und später auf mRNA-Ebene als ebenfalls nur schwach CAR-positiv validiert.

Inwieweit nun CAR4/6 in Zusammenhang zur Zervixkarzinogenese gebracht werden kann, soll im Weiteren betrachtet werden. Die innerhalb dieser Arbeit evaluierte Vielfalt der verschiedenen starken CAR4/6-Signale für C33A, CaSki, HeLa und SiHa als Zelllinien zervikalen Ursprungs sowie der prozentuale Anteil mikrosezierter, CAR4/6-negativer Zervixkarzinome deutet an, dass eine Deregulation von CAR4/6 nicht initial zum Erhalt des tumorigenen Phänotyps beiträgt. Es bleibt aber Raum für die Fragestellung, ob alternatives Spleißen des Rezeptors im CxCa mit der Progression von Karzinomen in Verbindung zu bringen ist oder mit einer schlechten Prognose korreliert. In dieser Arbeit durchgeführte funktionelle Analysen evaluierten CAR4/6-Charakteristika, die dem Protein eingeschränkt onkogenes Potenzial zuweisen. Direkte Zusammenhänge zwischen HPV-Infektion und Karzinogenese sowie Expression und alternativem Spleißen des CAR-Gens sind vorstellbar. Ein Ansatz basiert auf HR-HPV E7-Interaktionen mit Histondeacetylasen [213]. Direkte Kontakte zwischen HDACs und HR-HPV E7 führen zu einer Hemmung der Deacetylierung von Histonen. Die so überdurchschnittlich stark acetylierten Histone stabilisieren eine aufgelockerte Nukleosomenstruktur und ermöglichen damit die Steigerung der Transkriptionsraten von Genen wie z.B. HIF1 α [214]. Belege für den Anstieg der CAR-Expression unter gleichen Voraussetzungen (HDAC-Hemmung) existieren und legen nahe, dass HR-HPV E7 auch zu einer verstärkten Transkription von CAR führt [67]. Eine Steigerung der Synthese viraler und zellulärer mRNA kann weiterhin mittels des HPV-regulierten Transkriptionsaktivators E2F erreicht werden. E2F-Proteine können HR-HPV E7-vermittelt aktiviert werden [215]. Diese Aktivierung kann sowohl direkt durch Interaktionen mit E7 als auch indirekt über den ubiquitininduzierten Abbau des E2F-Inhibitors pRb erfolgen. Für die Promotorregion innerhalb der 5'-UTR von CAR wiederum ist genau solch eine Transkriptionsfaktor-Bindestelle beschrieben [67]. Es ist daher davon auszugehen, dass auch über diesen Weg die Expression von CAR stimuliert wird. Ein dritter Aspekt befasst sich mit der Fähigkeit von HR-HPV E6 zur Assoziation mit PDZ-Domänen-Proteinen [168]. Mittels Ubiquitinierung werden diese von der E6-Ubiquitinligase markiert und so dem

proteasomalen Abbau zugeführt. Der Verlust von z.B. MAGI-1 als Target HPV16 E6-vermittelten Abbaus resultiert in einem Bruch der Tight Junctions und damit reduzierter Adhäsion zwischen benachbarten Zellen [169]. Auf diese Weise können Differenzierung und Proliferation in onkogener Weise beeinflusst werden. Denkbar ist, dass die betroffenen Zellen darauf hin möglicherweise versuchen, die HPV-vermittelten Effekte durch Hochregulation anderer TJ-Komponenten und Stabilisierung der Zell-Zell-Kontakte zu kompensieren. Das würde bedeuten, dass auch die Expression von CAR messbar ansteigt. Somit findet sich ein weiterer möglicher Grund für die hier diskutierten Daten. Alle Punkte implizieren, dass die Zunahme der Expression des Vollängentranskripts in HR-HPV-positiven CIN2/3 und Tumoren der Zervix HPV-basiert auftritt. Eine Ursache für die Genese speziell der alternativen Isoform CAR4/6 in CIN2/3 und CxCa liefert die viral induzierte Änderung der Expression regulatorischer Spleißfaktoren [177]. Auf diese Weise werden neben HPV-RNAs auch Gene des Wirts in veränderter Weise prozessiert. Damit schafft eine HPV-Infektion eine ideale Grundlage für verändertes Spleißen der CAR-prä-mRNA.

Die Frage, ob Tumorprogression an dieser Stelle wirklich auf einer Deregulation von CAR4/6 aufbaut, bleibt offen. Denn ebenfalls denkbar wäre, dass onkogene Änderungen in Transkription oder alternativem Spleißen erst in der Expression von CAR4/6 resultieren. Generell muss an dieser Stelle auch erwähnt werden, dass für die erfolgreiche Genese eines Tumors immer die Abfolge mehrerer definierter Schritte erforderlich ist. Also weder die Infektion mit HR-HPV noch die Anschaltung der CAR4/6-Expression induzieren in Einzelleistung die Ausbildung oder Progression eines CxCa. Neben hierfür relevanten Ereignissen wie Immortalisierung und Transformation beeinflussen auch Hemmung von Apoptose und Differenzierung sowie Akkumulation von Mutationen das Tumorgeschehen maßgeblich. Davon betroffen sein können Expression oder Regulation relevanter Onkogene (z.B. Wachstumsfaktoren, Zellzyklusregulatoren, Proteinkinasen) und Tumorsuppressorgene wie p16, p53 oder pRb (ebenfalls Zellzyklusregulatoren). Belege für diese Theorie liefert unter anderem die mittels HPV16 immortalisierte Keratinozytenzelllinie HPKIA. Diese als nicht-tumorigen charakterisierten Zellen zeigten nur nach Kotransfektion von aktiviertem K-ras als weiteres Onkogen sowie Gammabestrahlung oder Langzeitkultur zur Induktion weiterer Mutationen neoplastische Eigenschaften [216-217]. In Anlehnung daran und in Ermangelung von Publikationen diesbezüglich wird auch für HPKIII ein ähnlicher Phänotyp postuliert. Das eher schwache mRNA-Signal für CAR4/6 spricht zusätzlich dafür, dass diese Zelllinie nur wenig onkogenes Potenzial aufweist.

Das Prinzip der Synergie tumorpropagierender Effekte kann beliebig auf andere Tumorentitäten ausgeweitet werden. Mehrere Publikationen zu Veränderungen im Spleißmuster nicht HPV-induzierter Tumore sprechen für häufige Änderungen innerhalb der

Spleißmaschinerie während der Karzinogenese [179-180]. Dass CAR4/6 HPV-unabhängig in Tumoren exprimiert werden kann, belegt C33A als HPV-negative CxCa-Linie anhand eines starken CAR4/6-Signals. Auch die beiden Brustkrebszelllinien MCF7 und MCF10a zeigen eine zwar schwache, aber eindeutige Expression der neuen Isoform. Erste arbeitsgruppeninterne Daten zum Endometriumkarzinom lassen in diesem Kollektiv ebenfalls eine partielle CAR4/6-Expression vermuten. Über die Präsenz von CAR4/6 in Tumorentitäten nicht-gynäkologischen Ursprungs kann an dieser Stelle jedoch nur spekuliert werden. Aufgrund der Homogenität CAR4/6-negativer Proben in Geweben des Gastrointestinaltrakts scheint ein Probenkollektiv von Magen- oder Kolorektalkarzinomen für eine weitere Validierung der CAR4/6-Expression in Tumoren vielversprechend. Mit Tumorgeschehen korrelierende, alternative Spleißereignisse sind für beide Entitäten bereits beschrieben [218]. Interessant bleibt auch die Evaluierung der CAR4/6-Expression an Tumoren oder Zelllinienmodellen, für welche bereits eine veränderte Regulation der CAR-Expression nachgewiesen oder CAR-vermittelte funktionelle Effekte beobachtet wurden (z.B. Harnblase, Hirn oder Ösophagus [125-127]).

Unter Betrachtung der Fragestellung, ob CAR4/6 einen prognostischen Wert für die Tumorprogression oder die Ausbildung von Lymphknotenmetastasen besitzt, erfolgte ein Vergleich der CAR4/6-mRNA-Expressionslevel zwischen einzelnen Tumorstadien sowie zwischen Patientinnen mit unterschiedlichem Lymphknotenstatus. Äquivalent zum Normalgewebearray wurde auch an dieser Stelle Zervixnormalepithel als CAR4/6-negativ charakterisiert. Die Existenz der neuen CAR-Isoform betraf einzig entartete Zellen. Mögliche molekulare Grundlagen hierfür wurden bereits im vorangegangenen Abschnitt besprochen. Die Entstehung von CIN2/3 ging partiell mit einer Anschaltung der CAR4/6-Expression einher. Im Mittel fand sich jedoch - wie auch für CAR6/7 - trotz Tendenz nach oben keine weitere signifikante Zunahme der Expressionsmittelwerte von Tumorstadien (CIN2/3) zu hochgradigen Karzinomen (FIGO T3/T4). Diese Daten deuten an, dass die Deregulation von CAR ein sehr frühes Ereignis in der Zervixkarzinogenese darstellt. Denkbar ist außerdem ein positiver Einfluss von CAR4/6 auf den Übergang zum invasiven Karzinom. Belege hierfür liefern der prozentuale Anstieg CAR4/6-positiver Proben von 42 % (CIN2/3) auf bis zu 76 % (FIGO T3/T4) sowie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte funktionelle Assays, die CAR4/6 ein gewisses onkogenes Potenzial bescheinigen (Steigerung der Proliferation und Invasivität *in vitro*). CAR4/6-Expression in CIN könnte einen Selektionsvorteil für die Genese invasiver Tumoren bieten und somit deren Remission erschweren. Mit Bezug auf CAR4/6 im Zusammenhang zur Metastasierung erfolgte die Auswertung der Expressionsdaten hinsichtlich Lymphknotenstatus. Signifikante CAR4/6-Expressionsunterschiede zwischen N0 (ohne Lymphknotenbefall) und N1 (mit Lymphknotenbefall) wurden allein für das T3/T4-Kollektiv festgestellt. Tendenzen für eine verstärkte Expression der neuen Rezeptorisoform

in N1 fanden sich jedoch auch bei Tumoren mit FIGO T2. Diese Daten belegen eine Korrelation zwischen dem CAR4/6-mRNA-Gehalt in Tumoren und der Existenz lymphatischer Metastasen. Da wiederum ein eindeutiger Zusammenhang zwischen CxCa-basierten, nodalpositiven Lymphknoten und deutlich reduzierter 5-Jahres-Überlebensrate bekannt ist, scheint auch CAR4/6 mit einer schlechten Prognose einher zu gehen [141]. Inwieweit CAR4/6-vermittelte Invasion hiermit in Verbindung zu bringen ist, wird im folgenden Kapitel diskutiert. Die Hochregulation des Vollängentranskripts im T2- und T3/T4-Kollektiv wird an dieser Stelle als Versuch einer Gegenregulation CAR4/6-vermittelter Effekte gewertet, mit welchem die Zellen z.B. besser am Primärtumor verankert werden sollen. Alternativ könnte der Anstieg der CAR6/7-Expression möglicherweise auch als Artefakt im Rahmen einer generellen Steigerung der Genese von CAR-prä-mRNA angesehen werden. Krankheitsverläufe oder Rezidivneigung wurden für die hier verwendeten Proben nicht mit CAR4/6-Expression korreliert. Diese Aspekte besitzen allerdings ebenfalls große Relevanz bei der Diskussion von CAR4/6 als möglichen Prognosemarker und sollten bei weiteren Arbeiten zusätzlich berücksichtigt werden. Ein Zusammenhang ist vorstellbar.

Abschließend sollen auch an dieser Stelle einige methodische Einschränkungen diskutiert werden. Zum einen basiert die Wertung der hier präsentierten Daten nahezu ausschließlich auf mRNA und ist damit unter Vorbehalt zu betrachten. Denn die Präsenz zellulärer mRNA ist kein Garant für die Synthese entsprechender, effektvermittelnder Proteine. Da jedoch in Ermangelung eines CAR4/6-spezifischen Antikörpers eine Differenzierung auf Proteinebene aktuell unmöglich ist, wurde sich auf die wesentlich besser quantifizierbare mRNA-Expression gestützt. Es bleibt abzuwarten, ob das - auf der hohen Sequenzhomologie zwischen CAR4/6- und CAR6/7-Protein basierende - Problem der immunhistochemischen Unterscheidbarkeit im Gewebeschnitt in Zukunft gelöst werden kann. Aufgrund von Problemen mit unspezifischen Hintergrundsignalen scheint die Sensitivität des Western Blots unzureichend für die Detektion von CAR in mikroseziertem Gewebe. Zum anderen flossen auch hier, begründet in der Verwendung manueller Mikrodisektion, nur geringe Gewebemengen in die Analyse ein. Um Verluste im Rahmen der RNA-Aufreinigung zu umgehen, wurden die Zellen unaufgereinigt in die PCR eingesetzt. Dies führte möglicherweise zu einer schlechteren Zugänglichkeit der Transkripte und resultierte in Signalverlusten. Obwohl nach Aufreinigung mittels konventioneller Methode kein RNA-Signal messbar war, weisen erste Daten des Folgeprojekts auf eine Steigerung der Sensitivität des CAR4/6-Nachweises nach RNA-Isolation hin. Dies spricht für die Möglichkeit des sondenbasierten Nachweises auch geringster, nicht messbarer Mengen an CAR-mRNA mittels der in dieser Arbeit etablierten Spleißvarianten-spezifischen quantitativen RealTime-PCR. Anhand der hier präsentierten Daten ist jedoch - trotz methodischer Einschränkungen - gesichert, dass es im Prozess der Zervixkarzinogenese zu einem deutlichen Anstieg der

CAR4/6-mRNA-Expression kommt. Die Expressionslevel in Patientinnen mit nodalpositiven Lymphknoten unterscheiden sich in hochgradigen Tumoren signifikant von denen nodalnegativer Patientenproben.

5.3. Funktionelle Analysen

Inwieweit nun CAR4/6 auf Proteinebene in der Lage ist, funktionell wirksam zu werden, wird im Folgenden diskutiert. Im Zellkulturmodell erfolgte eine ektopische Überexpression beider membranständiger CAR-Isoformen. Die Präsenz verschiedener Varianten wurde anhand von Fluoreszenzmarkierungen und mittels Western Blot validiert. Die Evaluierung möglicher Einflüsse auf zelluläre Eigenschaften erfolgte im Anschluss. Schnell zeigte sich, dass CAR4/6 auch HPV-unabhängig agieren kann. CAR4/6-vermittelte Effekte auf zelluläres Wachstum in HeLa und SW756 wurden im Fibrosarkommodell bestätigt. Gesteigerte Invasion fand sich sogar nur in HPV-negativen Linien. Doch auch das Vollängentranskript war - auf niedrigerem Level und teilweise zeitlich verzögert - durchaus in der Lage, die Proliferation *in vitro* zu erhöhen. Dieses Ergebnis steht in starkem Gegensatz zu zahlreichen Publikationen, die durch ektopische Expression des CAR6/7-Transkripts eher einen wachstumshemmenden Effekt erzielen oder eine verringerte Expression von CAR mit gesteigertem Tumorwachstum in Verbindung bringen [124, 126]. Das in diesen Arbeiten diskutierte Prinzip „Hohe CAR-Expressionslevel - niedrige Wachstumsraten“ ist jedoch nicht mit der nachweislich starken Expression des Vollängentranskripts im Rahmen von embryonaler Entwicklung und Geweberegeneration in Einklang zu bringen. Beide Prozesse basieren auch auf zellulärer Proliferation. Unter Berücksichtigung dieses Aspekts sollte CAR6/7 nicht als generell proliferationshemmend beschrieben werden. Je nach System und Zusammenspiel mehrerer Umgebungsfaktoren deuten hier gezeigte Daten sogar auf einen möglichen wachstumssteigernden Effekt von CAR6/7 auch in Tumoren hin. Denkbare molekulare Grundlagen hierfür finden sich zum einen in der Kerntranslokation von β -Catenin nach CAR-Überexpression [219]. Eine auf diese Weise induzierte Steigerung der c-myc-Expression kann die Regulation zahlreicher Gene beeinflussen. C-myc als Protoonkogen steht in direktem Zusammenhang zur unkontrollierten Proliferation von Tumorzellen. Zum Zweiten steigert eine CAR-Überexpression in Brustkrebszellen auch die Basalaktivität der p42/p44 MAP-Kinase (entspricht ERK1/2) [220]. In aktiver Form vermittelt diese die Induktion von ZyklinD1 und treibt über die Phosphorylierung spezieller Transkriptionsfaktoren die Progression des Zellzyklus und somit auch die Proliferation voran. Ob einer dieser beiden Prozesse in dem hier gezeigten Modell der Proliferationssteigerung durch CAR6/7 zugrunde liegt oder noch andere Signalwege eine Rolle spielen, muss in weiteren Arbeiten aufgeklärt werden.

Zahlreiche vorangegangene Arbeiten belegen, dass Tumorentstehung und -progression häufig mit einer Abnahme der Expression von CAR einher geht [105]. Diese Abnahme könnte mit der Überexpression von Raf-1 als Komponente des MAPK-Weges in Verbindung gebracht werden und auch MEK offenbarte einen negativen Einfluss auf die Expressionslevel von CAR [68]. Obwohl diese Signalkomponenten CAR in seiner Expression negativ beeinflussen können, ist im Umkehrschluss nicht gesichert, welche Effekte von CAR ausgehend auf diesen oder andere Signalwege vermittelt werden können. ERK-stimulierende Einflüsse seitens CAR wurden bereits erwähnt [220]. Dies spricht für die Komplexität von Signalwegen und deren Regulationsmechanismen, die aus verschiedensten Richtungen aktiviert werden und sich in unterschiedlichste Richtungen hin entwickeln können. Die hier diskutierte Arbeit verzeichnete eine Zunahme der CAR-mRNA-Level im CxCa. Einflüsse auf das Tumorgeschehen innerhalb der Zervix über den CAR-unterdrückenden, häufig in Tumoren deregulierten MAPK-Weg sind daher eher unwahrscheinlich und auch nicht im Zellkulturmodell zu erwarten. Der tumorigene Effekt bei HT1080-Zellen hingegen basiert auf Veränderungen von N-ras, dem Initiator für die MAP-Kinase-Kaskade (ATCC). In diesem Fibrosarkom-Modell ist daher von einer deregulierten Signalübertragung über den MAPK-Weg auszugehen. Da HT1080-Zellen nach CAR-Überexpression die deutlichsten Änderungen ihrer Eigenschaften aufwiesen, deutet sich eine Synergie aus N-ras-Mutation und CAR-vermittelten Effekten auf ERK und/oder andere Signalkomponenten an.

MAPK-unabhängige, CAR4/6-vermittelte Effekte könnten auf einer veränderten Organisation des TJ-Komplexes beruhen. Denkbar ist eine CAR4/6-induzierte Störung der TJ-Integrität durch andersartige Faltung oder Interaktion mit Nachbarkomponenten, die in einer Lockerung des zytoplasmatisch lokalisierten Netzwerks TJ-assoziiierter Proteine resultiert. Dieses Gerüst dient der Verankerung von Signalmolekülen und Transkriptionsfaktoren, die verschiedenste Effekte vermitteln können. Unter der Annahme einer CAR4/6-induzierten membranalen Dislokation werden an dieser Stelle der Transkriptionsfaktor ZONAB und die Phosphatase PTEN näher beleuchtet. ZONAB ist über direkte Interaktionen zu ZO-1 TJ-assoziiert an der Zellmembran fixiert. Publikationen zeigen, dass eine erhöhte Expression von ZO-1 zu einer verstärkten Sequestrierung von ZONAB an der Membran führt, dessen transkriptionelle Aktivität reduziert und zelluläres Wachstum begrenzt [221]. Im Umkehrschluss ist mit einer verstärkten Freisetzung des Transkriptionsfaktors nach CAR4/6-induzierter Auflockerung der TJ und Dislokation von ZO-1 zu rechnen. ZONAB könnte dann weniger gut an der Membran immobilisiert werden, transloziert in den Kern und vermittelt ebenso verstärkte Proliferation, wie durch ektopische ZONAB-Expression bereits belegt [25]. Der Tumorsuppressor PTEN beeinflusst Signalwege auf andere Weise. Die nur in Membrannähe aktivierte Phosphatase unterbricht durch Dephosphorylierung der sekundären

Botenstoffe PIP2 und PIP3 den PI3-Kinase/Proteinkinase B-Weg und kann so zelluläres Wachstum negativ beeinflussen [222]. Über die Dephosphorylierung von Komponenten weiterer, phosphorylierungsabhängiger Signalwege kann sie auch an anderen Stellen in die Signaltransduktion eingreifen. Werden jedoch über Veränderungen im TJ-Netzwerk die Interaktionen dieses Protein mit der TJ-Komponente MAGI gestört, ist vorstellbar, dass entweder PTEN selbst oder eine kooperierendes/aktivierendes Protein nicht korrekt positioniert werden kann. Die Aktivierung von PTEN wird verhindert und der Proteinkinase B-vermittelten Proliferation freien Lauf gelassen. Der fehlende Einfluss auf die Proliferation seitens CAR4/6 in MDA_MB435S macht deutlich, dass diese Effekte zell- oder gewebetypabhängig auftreten und kein generelles Phänomen darstellen. Ob der fehlende Einfluss auf zelluläres Wachstum der Melanomzelllinie darauf basiert, dass CAR4/6 auch im gesunden Hautgewebe funktionell wirksam scheint und daher auch nach ektopischer Expression in irgendeiner Form reguliert wird, bleibt abzuwarten.

Während nach CAR-Transfektion im Migrationsassay signifikante Effekte beider Isoformen nur in HeLa auftraten, zeigten CAR4/6-positive HT1080- und MDA_MB435S-Zellen eine gesteigerte Invasivität. Im Bezug auf Migration ist ein Zusammenhang zu CAR-vermittelten Interaktionen mit den Zytoskelettkomponenten Aktin und Tubulin denkbar. Eine veränderte Proteinfaltung innerhalb der extrazellulären Domäne könnte sich sterisch auf die Konformation des zytoplasmatischen Teils auswirken, Wechselwirkungen zum Zytoskelett lockern und damit die Dynamik von Aktin und/oder Tubulin positiv beeinflussen. Dies ermöglicht eventuell die gesteigerte Mobilität CAR4/6-positiver HeLa-Zellen. Erneut im Gegensatz zu bereits publizierten Daten zeigt sich in dieser Arbeit auch CAR6/7 prinzipiell dazu in der Lage, zelluläre Migration zu erhöhen [102]. Trotz fehlender Hinweise auf molekulare Ursachen, deuten diese Daten wiederholt auf eine mögliche duale Rolle des Rezeptors im biologischen System. Neben seiner Funktion als putativer Tumorsuppressor scheint CAR6/7 unter bestimmten Voraussetzungen durchaus auch dazu in der Lage, onkogene Effekte zu vermitteln. Diese beruhen auf seiner ursprünglichen Funktion in Embryogenese und Regeneration. Beide Prozesse gehen maßgeblich mit Wachstum und Migration von Zellen einher und zeigen nachweislich eine verstärkt CAR6/7-Expression. Eine Verbindung zwischen diesen Vorgängen wurde bisher jedoch nie gezogen. HeLa als, im hier vorliegenden Kollektiv, einzige beeinflussbare Zelllinie ähnelt möglicherweise in seiner Konstitution eher embryonalen Zellen. Im embryonalen System basiert die Organisation der Gewebestrukturen unter anderem auf zellulärer Migration. Deren Hemmung wäre ein wesentlicher Nachteil für die Entwicklung. Unter Annahme der Ähnlichkeit zwischen HeLa und embryonalen Zellen, vermittelt die ektopische Expression von CAR6/7 eben keine Hemmung, sondern in diesem Falle sogar eine Steigerung der Migration. Trotz allem waren in HT1080, SW756 und MDA_MB435S keine CAR-vermittelten, migratorischen Effekte

nachweisbar. Dies deutet an, dass beide Isoformen nur geringe, scheinbar sehr von anderen Faktoren abhängige Einflüsse auf die Migration ausüben können. Ähnlich selektive Effekte zeichnen sich auch im Invasionsassay ab. Während sich die beiden zervikalen Linien in ihrem Invasionsverhalten nicht von CAR beeinflussen lassen, zeigen HT1080 und MDA_MB435S als per se invasive Linien einen deutlichen Anstieg ihrer Invasivität. Der vorangegangene Assay belegt, dass diese Zunahme nicht auf einer erhöhten Mobilität der Zellen basiert. Mit großer Wahrscheinlichkeit bewirkt die Expression von CAR4/6 - möglicherweise wiederum über die Auflockerung des TJ-Netzwerkes und äquivalent zur Beeinflussung zellulärer Proliferation - die Freisetzung spezieller TJ-assoziiierter Faktoren, welche die Expression oder Aktivierung membrangebundener Matrix-Metalloproteinasen (MMP) in positiver Weise beeinflussen. Ebenfalls denkbar ist eine CAR4/6-vermittelte, negative Korrelation oder Hemmung der MMP-Gewebeinhibitoren TIMP (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases). MMPs vermitteln den Abbau der extrazellulären Matrix und tragen damit zu benignen Prozessen wie der Extravasation von Leukozyten oder dem Auf-, Um- und Abbau von Geweben bei. Im Tumorgeschehen besitzen sie große Relevanz für Tumordinfiltration und Metastasierung. Sowohl die Aktivierung von TIMP als auch die Reduktion der Sekretion und/oder Aktivität von MMPs wurden bereits mit PTEN-Überexpression korreliert [223]. Der Verlust aktivierter PTEN könnte somit durchaus zur Steigerung der MMP-Expression und damit auch der Invasion beitragen. Ein möglicher zweiter Effektor findet sich in ZO-1, welches als TJ-assoziiertes Protein sogar in direktem Kontakt zu CAR6/7 steht. Eine zytoplasmatische ZO-1-Lokalisation resultiert in der Expression von MMPs und korreliert direkt mit dem invasiven Potenzial entsprechender Zellen [224]. Es ist vorstellbar, dass in dieser, wohl ebenfalls durch CAR4/6-Überexpression erzielten, Orientierung der sonst ZO-1-assoziierte Transkriptionsfaktor ZONAB freigesetzt wird und im Zellkern die Expression der MMPs positiv beeinflussen kann. Beides sind theoretische Ansätze für die molekulare Grundlage der CAR4/6-vermittelten Steigerung der Invasivität und damit auch der Korrelation zwischen CAR4/6-Expression und verstärkter Präsenz von Lymphknotenmetastasen.

Im Hinblick auf zelluläre Adhäsion zeigte sich einzig in CAR4/6-transfizierten HeLa eine signifikant reduzierte Adhäsion an Fibronectin. Verantwortlich hierfür scheint unter anderem der partielle Verlust der D2-Domäne, welche nachweislich eine Fibronectin-Bindestelle umfasst [43]. Ob diese Bindestelle mit Exon 5 verloren geht oder aufgrund andersartiger Faltung zwar in CAR4/6 erhalten bleibt, aber wesentlich schlechter zugänglich ist, bleibt ungewiss. Ebenfalls kann auch an dieser Stelle wiederum eine Verbindung zur CAR4/6-vermittelten Auflockerung des zytoplasmatischen TJ-Gerüsts gezogen werden. MAGI-1 als Interaktionspartner von CAR6/7 ist zu Wechselwirkungen mit Rap-GEF (GDP/GTP exchange factor) in der Lage. Dieser Faktor aktiviert Rap und reguliert MAPK-abhängig unter anderem

auch zelluläre Adhäsion über Integrine und Cadherine. Bewirkt nun eine ektopische CAR4/6-Expression Störungen in der TJ-Integrität, kann auch MAGI-1 davon betroffen sein. Ohne MAGI-1 wird weniger Rap-GEF an der Membran positioniert und weniger Rap kann aktiviert werden. Effekte auf zelluläre Adhäsion sind denkbar. Loss-of-function Rap-GEF-Mutationen in *Drosophila* resultieren im Ablösen von Stammzellen aus ihrer Nische und einem damit einhergehenden Verlust von Stammzeleigenschaften [225]. Diese Arbeiten verknüpfen ein weiteres Mal die Expression der neuen Isoform von CAR sowohl mit direkten und indirekten Änderungen der CAM-Expression als auch mit dem bereits im Zusammenhang zu CAR4/6 diskutierten Ablösen sich differenzierender Zellen aus einer Stammzellnische. Da HeLa als einzige Linie durch CAR4/6 beeinflussbar ist, scheinen Änderungen im Adhäsionsverhalten ebenfalls nur zelltypabhängig aufzutreten. Ob diese Veränderungen in HT1080, SW756 und MDA_MB435S nicht stattfinden oder mittels anderer Komponenten kompensiert werden können, kann an dieser Stelle nicht aufgeklärt werden.

Untersuchungen zum Wachstum CAR-transfizierter Zellen im Weichagar generierten keine neuen Erkenntnisse. Weder das Vollängentranskript noch CAR4/6 induzierten Koloniewachstum auf Basis von Einzelzellen und deuteten damit eine Relevanz beim Auswachsen disseminierter Tumorzellen zu peripheren Metastasen an. Der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene Zusammenhang zwischen CAR4/6-Expression und Lymphknotenmetastasierung beruht daher wohl im Wesentlichen auf einer besseren Ablösung von Tumorzellen aus ihrem Verband (Fibronectin- und Rap-GEP-basiert) sowie der erleichterten Überwindung von ECM-Barrierern (MMP-basiert). Das ankerungsunabhängige Auswachsen gestreuter Tumorzellen in der Peripherie scheint von zusätzlichen Faktoren initiiert und gesteuert zu werden.

5.4. Ausblick

Die hier präsentierte Arbeit lieferte erste wichtige Anhaltspunkte zu Verteilung und biologischer Funktion von CAR4/6 als trunkierte Spleißvariante des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors. Sie stellt jedoch nur einen ersten Vorstoß zur Abschätzung der histologischen Verbreitung sowie des onkogenen Potenzials von CAR4/6 dar. Eine vollständige Aufklärung seiner Relevanz bezüglich Tumorentstehung und -progression sowie einer möglichen Einflussnahme auch auf Prozesse der Gewebeorganisation im benignen Umfeld erfordert umfassende Folgeprojekte.

Eine detaillierte Aufklärung der Proteinfaltung und Domänenstruktur von CAR4/6 sollte die Basis weiterer Arbeiten bilden und daher an erster Stelle stehen. Die Evaluierung CAR4/6-vermittelter TJ-Integrität in Kombination mit Interaktionsstudien bezüglich TJ-assoziierter Komponenten könnte im Anschluss zur Klärung zahlreicher aufgeworfener Fragestellungen beitragen. Ausmaß und Stabilität putativer Wechselwirkungen liefern möglicherweise weitere Hinweise auf biologische Funktionen, die im Folgenden anhand neuer funktioneller *in vitro* und *in vivo* Assays validiert werden müssten. Neben konventioneller ektopischer Expression des Proteins scheint hierfür ein siRNA-Knockdown von CAR vielversprechend. Die Aufklärung CAR4/6-vermittelter Signalwege würde ebenso zum Verständnis dieser Isoform beitragen wie die Evaluierung seiner Rolle in der Stammzelldifferenzierung. Neue Daten hinsichtlich des Beitrags von CAR4/6 zu Selektivität oder Barrierefunktion von Tight Junction wären ebenfalls hilfreich. Auch die Vermittlung viraler Effekte durch CAR4/6 war Teil der hier diskutierten Hypothesen und sollte im Folgenden ausgiebig erforscht werden. Auf histologischer Ebene liefert die Fragestellung nach detaillierteren Expressionsmustern sowohl in Normalgeweben als auch in Tumoren verschiedenster Entität zahlreiche Arbeitsansätze. Schlussendlich stellt sich auch die Frage nach der Relevanz von CAR4/6 im Tumorgeschehen. Denkbar sind Anwendungen als Prognosefaktor oder zusätzlicher Marker für Präkanzerosen der Zervix bzw. anderer Gewebe.

Es wird deutlich, dass diese ersten Schritte in der Beschreibung von CAR4/6 als neue Isoform des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors noch lang kein vollständiges Bild von CAR4/6 als Protein zeichnen. Es bleibt daher spannend, ob diese Variante im Weiteren eindeutiger als putatives Onkogen mit prognostischer Relevanz charakterisiert werden kann und welche Funktionen sie im benignen Umfeld vermittelt.

6. Literaturverzeichnis

1. Caicedo-Carvajal, C.E., T. Shinbrot, and R.A. Foty, *Alpha5beta1 integrin-fibronectin interactions specify liquid to solid phase transition of 3D cellular aggregates*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11830.
2. Ratzinger, S., et al., *Induction of type XVI collagen expression facilitates proliferation of oral cancer cells*. Matrix Biol, 2011. **30**(2): p. 118-25.
3. Furuse, M., et al., *Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice*. J Cell Biol, 2002. **156**(6): p. 1099-111.
4. Eshkind, L., et al., *Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells*. Eur J Cell Biol, 2002. **81**(11): p. 592-8.
5. Cheung, L.W., P.C. Leung, and A.S. Wong, *Cadherin switching and activation of p120 catenin signaling are mediators of gonadotropin-releasing hormone to promote tumor cell migration and invasion in ovarian cancer*. Oncogene, 2010. **29**(16): p. 2427-40.
6. Belyantseva, I.A., et al., *Gamma-actin is required for cytoskeletal maintenance but not development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(24): p. 9703-8.
7. Flitney, E.W., et al., *Insights into the mechanical properties of epithelial cells: the effects of shear stress on the assembly and remodeling of keratin intermediate filaments*. FASEB J, 2009. **23**(7): p. 2110-9.
8. Abe, S., et al., *Expression of intermediate filaments at muscle insertions in human fetuses*. J Anat, 2010. **217**(2): p. 167-73.
9. Cavey, M. and T. Lecuit, *Molecular bases of cell-cell junctions stability and dynamics*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(5): p. a002998.
10. Delva, E., D.K. Tucker, and A.P. Kowalczyk, *The desmosome*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(2): p. a002543.
11. de Pereda, J.M., M.P. Lillo, and A. Sonnenberg, *Structural basis of the interaction between integrin alpha6beta4 and plectin at the hemidesmosomes*. EMBO J, 2009. **28**(8): p. 1180-90.
12. Bach, C.T., et al., *Tropomyosin isoform modulation of focal adhesion structure and cell migration*. Cell Adh Migr, 2010. **4**(2): p. 226-34.
13. Beaudry, V.G., et al., *Loss of the p53/p63 regulated desmosomal protein Perp promotes tumorigenesis*. PLoS Genet, 2010. **6**(10): p. e1001168.
14. Remy, L., et al., *Matrilysin 1 influences colon carcinoma cell migration by cleavage of the laminin-5 beta3 chain*. Cancer Res, 2006. **66**(23): p. 11228-37.
15. Xu, Y., et al., *Filamin A regulates focal adhesion disassembly and suppresses breast cancer cell migration and invasion*. J Exp Med, 2010. **207**(11): p. 2421-37.
16. Hou, J., et al., *Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(36): p. 15350-5.
17. Tokunaga, Y., et al., *A novel monoclonal antibody against the second extracellular loop of occludin disrupts epithelial cell polarity*. J Histochem Cytochem, 2007. **55**(7): p. 735-44.
18. Ikenouchi, J., et al., *Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(11): p. 4687-93.
19. Westphal, J.K., et al., *Tricellulin forms homomeric and heteromeric tight junctional complexes*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(12): p. 2057-68.
20. Van Itallie, C.M., et al., *Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **291**(6): p. F1288-99.
21. Markov, A.G., et al., *Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine*. J Comp Physiol B, 2010. **180**(4): p. 591-8.
22. Itoh, M., K. Morita, and S. Tsukita, *Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin*. J Biol Chem, 1999. **274**(9): p. 5981-6.
23. Lye, M.F., et al., *Insights into regulated ligand binding sites from the structure of ZO-1 Src homology 3-guanylate kinase module*. J Biol Chem, 2010. **285**(18): p. 13907-17.
24. Balda, M.S., M.D. Garrett, and K. Matter, *The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density*. J Cell Biol, 2003. **160**(3): p. 423-32.
25. Georgiadis, A., et al., *The tight junction associated signalling proteins ZO-1 and ZONAB regulate retinal pigment epithelium homeostasis in mice*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15730.
26. Sobel, G., et al., *Changes of cell adhesion and extracellular matrix (ECM) components in cervical intraepithelial neoplasia*. Pathol Oncol Res, 2005. **11**(1): p. 26-31.

27. Erin, N., et al., *Altered gene expression in breast cancer liver metastases*. Int J Cancer, 2009. **124**(7): p. 1503-16.
28. Petruzzelli, L., M. Takami, and H.D. Humes, *Structure and function of cell adhesion molecules*. Am J Med, 1999. **106**(4): p. 467-76.
29. Usui, T., et al., *Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled*. Cell, 1999. **98**(5): p. 585-95.
30. Goodwin, M., et al., *Minimal mutation of the cytoplasmic tail inhibits the ability of E-cadherin to activate Rac but not phosphatidylinositol 3-kinase: direct evidence of a role for cadherin-activated Rac signaling in adhesion and contact formation*. J Biol Chem, 2003. **278**(23): p. 20533-9.
31. Handschuh, G., et al., *Single amino acid substitutions in conserved extracellular domains of E-cadherin differ in their functional consequences*. J Mol Biol, 2001. **314**(3): p. 445-54.
32. Niessen, C.M. and B.M. Gumbiner, *Cadherin-mediated cell sorting not determined by binding or adhesion specificity*. J Cell Biol, 2002. **156**(2): p. 389-399.
33. Schlegel, N., et al., *Desmoglein 2-mediated adhesion is required for intestinal epithelial barrier integrity*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010. **298**(5): p. G774-83.
34. Biswas, S., M.R. Emond, and J.D. Jontes, *Protocadherin-19 and N-cadherin interact to control cell movements during anterior neurulation*. J Cell Biol, 2010. **191**(5): p. 1029-41.
35. Barnes, S.H., et al., *Cadherin-7 and cadherin-6B differentially regulate the growth, branching and guidance of cranial motor axons*. Development, 2010. **137**(5): p. 805-14.
36. Kolegraff, K., et al., *Loss of desmocollin-2 confers a tumorigenic phenotype to colonic epithelial cells through activation of Akt/ β -catenin signaling*. Mol Biol Cell, 2011.
37. Ribeiro, A.S., et al., *Extracellular cleavage and shedding of P-cadherin: a mechanism underlying the invasive behaviour of breast cancer cells*. Oncogene, 2010. **29**(3): p. 392-402.
38. McEver, R.P., *Properties of GMP-140, an inducible granule membrane protein of platelets and endothelium*. Blood Cells, 1990. **16**(1): p. 73-80; discussion 80-3.
39. Tedder, T.F., et al., *Isolation and chromosomal localization of cDNAs encoding a novel human lymphocyte cell surface molecule, LAM-1. Homology with the mouse lymphocyte homing receptor and other human adhesion proteins*. J Exp Med, 1989. **170**(1): p. 123-33.
40. Labow, M.A., et al., *Characterization of E-selectin-deficient mice: demonstration of overlapping function of the endothelial selectins*. Immunity, 1994. **1**(8): p. 709-20.
41. St Hill, C.A., D. Baharo-Hassan, and M. Farooqui, *C2-O-sLeX glycoproteins are E-selectin ligands that regulate invasion of human colon and hepatic carcinoma cells*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e16281.
42. Kohler, S., et al., *E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung*. Br J Cancer, 2010. **102**(3): p. 602-9.
43. Patzke, C., et al., *The coxsackievirus-adenovirus receptor reveals complex homophilic and heterophilic interactions on neural cells*. J Neurosci, 2010. **30**(8): p. 2897-910.
44. Hagiyaama, M., et al., *Expression of a soluble isoform of cell adhesion molecule 1 in the brain and its involvement in directional neurite outgrowth*. Am J Pathol, 2009. **174**(6): p. 2278-89.
45. Liu, J., et al., *The cloning and preliminarily functional analysis of the human neurotrimin gene*. Sci China C Life Sci, 2004. **47**(2): p. 158-64.
46. Vitureira, N., et al., *Podocalyxin is a novel polysialylated neural adhesion protein with multiple roles in neural development and synapse formation*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12003.
47. Xenaki, D., et al., *F3/contactin and TAG1 play antagonistic roles in the regulation of sonic hedgehog-induced cerebellar granule neuron progenitor proliferation*. Development, 2011. **138**(3): p. 519-29.
48. Porter, J.C. and A. Hall, *Epithelial ICAM-1 and ICAM-2 regulate the egression of human T cells across the bronchial epithelium*. FASEB J, 2009. **23**(2): p. 492-502.
49. Abaira, V.E., et al., *Cross-repressive interactions between Lrig3 and netrin 1 shape the architecture of the inner ear*. Development, 2008. **135**(24): p. 4091-9.
50. Wang, B., et al., *RNAi-mediated silencing of CD147 inhibits tumor cell proliferation, invasion and increases chemosensitivity to cisplatin in SGC7901 cells in vitro*. J Exp Clin Cancer Res, 2010. **29**: p. 61.
51. Barczyk, M., S. Carracedo, and D. Gullberg, *Integrins*. Cell Tissue Res, 2010. **339**(1): p. 269-80.
52. Abram, C.L. and C.A. Lowell, *The ins and outs of leukocyte integrin signaling*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 339-62.
53. Hamidouche, Z., et al., *Priming integrin α 5 promotes human mesenchymal stromal cell osteoblast differentiation and osteogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(44): p. 18587-91.

54. Fagerholm, S.C., et al., *alpha-Chain phosphorylation of the human leukocyte CD11b/CD18 (Mac-1) integrin is pivotal for integrin activation to bind ICAMs and leukocyte extravasation*. Blood, 2006. **108**(10): p. 3379-86.
55. Laurens, N., et al., *Single and combined effects of alphavbeta3- and alpha5beta1-integrins on capillary tube formation in a human fibrinous matrix*. Angiogenesis, 2009. **12**(3): p. 275-85.
56. Hazelbag, S., et al., *Overexpression of the alpha v beta 6 integrin in cervical squamous cell carcinoma is a prognostic factor for decreased survival*. J Pathol, 2007. **212**(3): p. 316-24.
57. Toquet, C., et al., *ADAM15 to alpha5beta1 integrin switch in colon carcinoma cells : A late event in cancer progression associated with tumor dedifferentiation and poor prognosis*. Int J Cancer, 2010.
58. Mapoles, J.E., D.L. Krah, and R.L. Crowell, *Purification of a HeLa cell receptor protein for group B coxsackieviruses*. J Virol, 1985. **55**(3): p. 560-6.
59. Hsu, K.H., et al., *A monoclonal antibody specific for the cellular receptor for the group B coxsackieviruses*. J Virol, 1988. **62**(5): p. 1647-52.
60. Bergelson, J.M., et al., *Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5*. Science, 1997. **275**(5304): p. 1320-3.
61. Bowles, K.R., et al., *Genomic organization and chromosomal localization of the human Coxsackievirus B-adenovirus receptor gene*. Hum Genet, 1999. **105**(4): p. 354-9.
62. Bezzina, C.R., et al., *Genome-wide association study identifies a susceptibility locus at 21q21 for ventricular fibrillation in acute myocardial infarction*. Nat Genet, 2010. **42**(8): p. 688-91.
63. Excoffon, K.J., et al., *Isoform-specific regulation and localization of the coxsackie and adenovirus receptor in human airway epithelia*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9909.
64. Chen, J.W., et al., *Structure and chromosomal localization of the murine coxsackievirus and adenovirus receptor gene*. DNA Cell Biol, 2003. **22**(4): p. 253-9.
65. Bergelson, J.M., et al., *The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses*. J Virol, 1998. **72**(1): p. 415-9.
66. Dorner, A., et al., *Alternatively spliced soluble coxsackie-adenovirus receptors inhibit coxsackievirus infection*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18497-503.
67. Pong, R.C., et al., *Epigenetic regulation of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) gene promoter in urogenital cancer cells*. Cancer Res, 2003. **63**(24): p. 8680-6.
68. Anders, M., et al., *Inhibition of the Raf/MEK/ERK pathway up-regulates expression of the coxsackievirus and adenovirus receptor in cancer cells*. Cancer Res, 2003. **63**(9): p. 2088-95.
69. Lacher, M.D., et al., *Transforming growth factor-beta receptor inhibition enhances adenoviral infectability of carcinoma cells via up-regulation of Coxsackie and Adenovirus Receptor in conjunction with reversal of epithelial-mesenchymal transition*. Cancer Res, 2006. **66**(3): p. 1648-57.
70. Vincent, T., et al., *Cytokine-mediated downregulation of coxsackievirus-adenovirus receptor in endothelial cells*. J Virol, 2004. **78**(15): p. 8047-58.
71. Ruppert, V., et al., *Activation of STAT1 transcription factor precedes up-regulation of coxsackievirus-adenovirus receptor during viral myocarditis*. Cardiovasc Pathol, 2008. **17**(2): p. 81-92.
72. Jiang, S., et al., *Solution structure of the coxsackievirus and adenovirus receptor domain 1*. Biochemistry, 2004. **43**(7): p. 1847-53.
73. Jiang, S. and M. Caffrey, *Solution structure of the coxsackievirus and adenovirus receptor domain 2*. Protein Sci, 2007. **16**(3): p. 539-42.
74. Excoffon, K.J., et al., *Functional effects of coxsackievirus and adenovirus receptor glycosylation on homophilic adhesion and adenoviral infection*. J Virol, 2007. **81**(11): p. 5573-8.
75. van't Hof, W. and R.G. Crystal, *Fatty acid modification of the coxsackievirus and adenovirus receptor*. J Virol, 2002. **76**(12): p. 6382-6.
76. Excoffon, K.J., et al., *A role for the PDZ-binding domain of the coxsackie B virus and adenovirus receptor (CAR) in cell adhesion and growth*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 19): p. 4401-9.
77. Fechner, H., et al., *Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers*. Gene Ther, 1999. **6**(9): p. 1520-35.
78. Freimuth, P., L. Philipson, and S.D. Carson, *The coxsackievirus and adenovirus receptor*. Curr Top Microbiol Immunol, 2008. **323**: p. 67-87.
79. Ashbourne Excoffon, K.J., T. Moninger, and J. Zabner, *The coxsackie B virus and adenovirus receptor resides in a distinct membrane microdomain*. J Virol, 2003. **77**(4): p. 2559-67.

80. Cohen, C.J., et al., *Multiple regions within the coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic domain are required for basolateral sorting*. J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 25392-8.
81. Excoffon, K.J., G.L. Traver, and J. Zabner, *The role of the extracellular domain in the biology of the coxsackievirus and adenovirus receptor*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **32**(6): p. 498-503.
82. Noutsias, M., et al., *Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections*. Circulation, 2001. **104**(3): p. 275-80.
83. Tomko, R.P., R. Xu, and L. Philipson, *HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(7): p. 3352-6.
84. Shaw, C.A., et al., *Isoform-specific expression of the Coxsackie and adenovirus receptor (CAR) in neuromuscular junction and cardiac intercalated discs*. BMC Cell Biol, 2004. **5**(1): p. 42.
85. Persson, A., et al., *Cell type- and region-dependent coxsackie adenovirus receptor expression in the central nervous system*. J Neurooncol, 2006. **78**(1): p. 1-6.
86. Korn, W.M., et al., *Expression of the coxsackievirus- and adenovirus receptor in gastrointestinal cancer correlates with tumor differentiation*. Cancer Gene Ther, 2006. **13**(8): p. 792-7.
87. Zanone, M.M., et al., *Human pancreatic islet endothelial cells express coxsackievirus and adenovirus receptor and are activated by coxsackie B virus infection*. FASEB J, 2007. **21**(12): p. 3308-17.
88. Mirza, M., et al., *Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) is expressed in male germ cells and forms a complex with the differentiation factor JAM-C in mouse testis*. Exp Cell Res, 2006. **312**(6): p. 817-30.
89. Thoelen, I., et al., *Identification of alternative splice products encoded by the human coxsackie-adenovirus receptor gene*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **287**(1): p. 216-22.
90. Reimer, D., et al., *Soluble isoforms but not the transmembrane form of coxsackie-adenovirus receptor are of clinical relevance in epithelial ovarian cancer*. Int J Cancer, 2007. **120**(12): p. 2568-75.
91. Auer, D., et al., *Expression of coxsackie-adenovirus receptor is related to estrogen sensitivity in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2009. **116**(1): p. 103-11.
92. Fechner, H., et al., *Induction of coxsackievirus-adenovirus-receptor expression during myocardial tissue formation and remodeling: identification of a cell-to-cell contact-dependent regulatory mechanism*. Circulation, 2003. **107**(6): p. 876-82.
93. Hotta, Y., et al., *Developmental distribution of coxsackie virus and adenovirus receptor localized in the nervous system*. Brain Res Dev Brain Res, 2003. **143**(1): p. 1-13.
94. Ahn, J., et al., *Primary neurons become less susceptible to coxsackievirus B5 following maturation: the correlation with the decreased level of CAR expression on cell surface*. J Med Virol, 2008. **80**(3): p. 434-40.
95. Chen, J.W., et al., *Cardiomyocyte-specific deletion of the coxsackievirus and adenovirus receptor results in hyperplasia of the embryonic left ventricle and abnormalities of sinuatrial valves*. Circ Res, 2006. **98**(7): p. 923-30.
96. Ito, T., et al., *Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR)-positive immature osteoblasts as targets of adenovirus-mediated gene transfer for fracture healing*. Gene Ther, 2003. **10**(18): p. 1623-8.
97. Sinnreich, M., et al., *Localization of coxsackie virus and adenovirus receptor (CAR) in normal and regenerating human muscle*. Neuromuscul Disord, 2005. **15**(8): p. 541-8.
98. Raschperger, E., et al., *The coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) is an in vivo marker for epithelial tight junctions, with a potential role in regulating permeability and tissue homeostasis*. Exp Cell Res, 2006. **312**(9): p. 1566-80.
99. Cohen, C.J., et al., *The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 15191-6.
100. Coyne, C.B., et al., *The coxsackievirus and adenovirus receptor interacts with the multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) within the tight junction*. J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 48079-84.
101. Coyne, C.B. and J.M. Bergelson, *CAR: a virus receptor within the tight junction*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(6): p. 869-82.
102. Fok, P.T., et al., *The Coxsackie and adenovirus receptor binds microtubules and plays a role in cell migration*. J Biol Chem, 2007. **282**(10): p. 7512-21.

103. Huang, K.C., et al., *Interaction of the Cocksackie and adenovirus receptor (CAR) with the cytoskeleton: binding to actin*. FEBS Lett, 2007. **581**(14): p. 2702-8.
104. Huang, K.C., et al., *Impact of the coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on glioma cell growth and invasion: requirement for the C-terminal domain*. Int J Cancer, 2005. **113**(5): p. 738-45.
105. Anders, M., et al., *Loss of the coxsackie and adenovirus receptor contributes to gastric cancer progression*. Br J Cancer, 2009. **100**(2): p. 352-9.
106. Liu, P.P. and M.A. Opavsky, *Viral myocarditis: receptors that bridge the cardiovascular with the immune system?* Circ Res, 2000. **86**(3): p. 253-4.
107. Ito, M., et al., *Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor in hearts of rats with experimental autoimmune myocarditis*. Circ Res, 2000. **86**(3): p. 275-80.
108. Carson, S.D. and N.M. Chapman, *Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) binds immunoglobulins*. Biochemistry, 2001. **40**(48): p. 14324-9.
109. Lim, B.K., et al., *Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) mediates atrioventricular-node function and connexin 45 localization in the murine heart*. J Clin Invest, 2008. **118**(8): p. 2758-70.
110. Sollerbrant, K., et al., *The Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) forms a complex with the PDZ domain-containing protein ligand-of-numb protein-X (LNX)*. J Biol Chem, 2003. **278**(9): p. 7439-44.
111. Schoub, B.D., et al., *Epidemic Coxsackie B virus infection in Johannesburg, South Africa*. J Hyg (Lond), 1985. **95**(2): p. 447-55.
112. Kim, E.O., et al., *Quantitative analysis of viral RNA in the murine heart and pancreas with different concentration of coxsackievirus B3*. Intervirology, 2006. **49**(4): p. 192-9.
113. Goodfellow, I.G., et al., *Inhibition of coxsackie B virus infection by soluble forms of its receptors: binding affinities, altered particle formation, and competition with cellular receptors*. J Virol, 2005. **79**(18): p. 12016-24.
114. Yajima, T. and K.U. Knowlton, *Viral myocarditis: from the perspective of the virus*. Circulation, 2009. **119**(19): p. 2615-24.
115. Kinchington, P.R., E.G. Romanowski, and Y. Jerold Gordon, *Prospects for adenovirus antivirals*. J Antimicrob Chemother, 2005. **55**(4): p. 424-9.
116. Wang, D., et al., *A complex adenovirus vaccine against chikungunya virus provides complete protection against viraemia and arthritis*. Vaccine, 2011. **29**(15): p. 2803-9.
117. Zhang, Y., et al., *Adenovirus carrying TIMP-3: a potential tool for cervical cancer treatment*. Gynecol Oncol, 2008. **108**(1): p. 234-40.
118. Arnberg, N., *Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting*. Rev Med Virol, 2009. **19**(3): p. 165-78.
119. Walters, R.W., et al., *Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape*. Cell, 2002. **110**(6): p. 789-99.
120. Alemany, R. and D.T. Curiel, *CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors*. Gene Ther, 2001. **8**(17): p. 1347-53.
121. Qin, M., et al., *Coxsackievirus adenovirus receptor expression predicts the efficiency of adenoviral gene transfer into non-small cell lung cancer xenografts*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(13): p. 4992-9.
122. Hemmi, S., et al., *The presence of human coxsackievirus and adenovirus receptor is associated with efficient adenovirus-mediated transgene expression in human melanoma cell cultures*. Hum Gene Ther, 1998. **9**(16): p. 2363-73.
123. Terao, S., et al., *Improved gene transfer into renal carcinoma cells using adenovirus vector containing RGD motif*. Anticancer Res, 2009. **29**(8): p. 2997-3001.
124. Sachs, M.D., et al., *Integrin alpha(v) and coxsackie adenovirus receptor expression in clinical bladder cancer*. Urology, 2002. **60**(3): p. 531-6.
125. Fuxe, J., et al., *Expression of the coxsackie and adenovirus receptor in human astrocytic tumors and xenografts*. Int J Cancer, 2003. **103**(6): p. 723-9.
126. Zhang, L.L., et al., *Overexpression of coxsackie and adenovirus receptor inhibit growth of human bladder cancer cell in vitro and in vivo*. Acta Pharmacol Sin, 2007. **28**(6): p. 895-900.
127. Anders, M., et al., *Expression and function of the coxsackie and adenovirus receptor in Barrett's esophagus and associated neoplasia*. Cancer Gene Ther, 2009. **16**(6): p. 508-15.
128. Giaginis, C., et al., *Evaluation of coxsackievirus and adenovirus receptor expression in human benign and malignant thyroid lesions*. APMIS, 2010. **118**(3): p. 210-21.
129. Gu, A.K., et al., *[Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor in non-small cell lung cancer and its significance]*. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2009. **31**(4): p. 278-81.
130. Martin, T.A., G. Watkins, and W.G. Jiang, *The Coxsackie-adenovirus receptor has elevated expression in human breast cancer*. Clin Exp Med, 2005. **5**(3): p. 122-8.

131. Matsumoto, K., et al., *Loss of coxsackie and adenovirus receptor expression is associated with features of aggressive bladder cancer*. Urology, 2005. **66**(2): p. 441-6.
132. Yamashita, M., et al., *Expression of coxsackie and adenovirus receptor reduces the lung metastatic potential of murine tumor cells*. Int J Cancer, 2007. **121**(8): p. 1690-6.
133. Hillemanns, P., C. Thaler, and R. Kimmig, *[Epidemiology and diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia--is the present concept of screening and diagnosis still current?]*. Gynakol Geburtshilfliche Rundsch, 1997. **37**(4): p. 179-90.
134. Koutsky, L., *Epidemiology of genital human papillomavirus infection*. Am J Med, 1997. **102**(5A): p. 3-8.
135. Bruni, L., et al., *Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings*. J Infect Dis, 2010. **202**(12): p. 1789-99.
136. Reimers, L.L., et al., *Etiologic heterogeneity for cervical carcinoma by histopathologic type, using comparative age-period-cohort models*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. **18**(3): p. 792-800.
137. Russo, E., E. Kupek, and R.M. Zanine, *Vaginal Delivery and Low Immunity Are Strongly Associated With High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in a High-Risk Population*. J Low Genit Tract Dis, 2011.
138. Verteramo, R., et al., *Human Papillomaviruses and genital co-infections in gynaecological outpatients*. BMC Infect Dis, 2009. **9**: p. 16.
139. Braendle, W., et al., *[Does hormonal contraception increase the risk for tumors?]*. Ther Umsch, 2009. **66**(2): p. 129-35.
140. Woodman, C.B., S.I. Collins, and L.S. Young, *The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(1): p. 11-22.
141. Kosary, C.L., *FIGO stage, histology, histologic grade, age and race as prognostic factors in determining survival for cancers of the female gynecological system: an analysis of 1973-87 SEER cases of cancers of the endometrium, cervix, ovary, vulva, and vagina*. Semin Surg Oncol, 1994. **10**(1): p. 31-46.
142. Bernard, H.U., et al., *Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments*. Virology, 2010. **401**(1): p. 70-9.
143. Parkin, D.M. and F. Bray, *Chapter 2: The burden of HPV-related cancers*. Vaccine, 2006. **24 Suppl 3**: p. S3/11-25.
144. Walboomers, J.M., et al., *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. J Pathol, 1999. **189**(1): p. 12-9.
145. Coglianò, V., et al., *Carcinogenicity of human papillomaviruses*. Lancet Oncol, 2005. **6**(4): p. 204.
146. Munoz, N., et al., *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer*. N Engl J Med, 2003. **348**(6): p. 518-27.
147. Smith, J.S., et al., *Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update*. Int J Cancer, 2007. **121**(3): p. 621-32.
148. Seedorf, K., et al., *Human papillomavirus type 16 DNA sequence*. Virology, 1985. **145**(1): p. 181-5.
149. Alloul, N. and L. Sherman, *The E2 protein of human papillomavirus type 16 is translated from a variety of differentially spliced polycistronic mRNAs*. J Gen Virol, 1999. **80** (Pt 1): p. 29-37.
150. Mistry, N., M. Simonsson, and M. Evander, *Transcriptional activation of the human papillomavirus type 5 and 16 long control region in cells from cutaneous and mucosal origin*. Virol J, 2007. **4**: p. 27.
151. Smeets, S.J., et al., *Immortalization of oral keratinocytes by functional inactivation of the p53 and pRb pathways*. Int J Cancer, 2011. **128**(7): p. 1596-605.
152. Duensing, S. and K. Munger, *The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability*. Cancer Res, 2002. **62**(23): p. 7075-82.
153. Liu, X., et al., *HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(44): p. 18780-5.
154. Liu, J.S., et al., *The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 27283-91.
155. Schweiger, M.R., J. You, and P.M. Howley, *Bromodomain protein 4 mediates the papillomavirus E2 transcriptional activation function*. J Virol, 2006. **80**(9): p. 4276-85.
156. Mole, S., S.G. Milligan, and S.V. Graham, *Human papillomavirus type 16 E2 protein transcriptionally activates the promoter of a key cellular splicing factor, SF2/ASF*. J Virol, 2009. **83**(1): p. 357-67.
157. Schweiger, M.R., et al., *Brd4-independent transcriptional repression function of the papillomavirus e2 proteins*. J Virol, 2007. **81**(18): p. 9612-22.

158. Hwang, E.S., T. Nottoli, and D. Dimaio, *The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells*. Virology, 1995. **211**(1): p. 227-33.
159. McIntosh, P.B., et al., *E1--E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 16): p. 2810-22.
160. Hagensee, M.E., N. Yaegashi, and D.A. Galloway, *Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins*. J Virol, 1993. **67**(1): p. 315-22.
161. Longworth, M.S. and L.A. Laimins, *Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(2): p. 362-72.
162. Pyeon, D., et al., *Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression*. PLoS Pathog, 2009. **5**(2): p. e1000318.
163. Shafti-Keramat, S., et al., *Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses*. J Virol, 2003. **77**(24): p. 13125-35.
164. Yoon, C.S., et al., *alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **283**(3): p. 668-73.
165. Durst, M., et al., *The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours*. J Gen Virol, 1985. **66** (Pt 7): p. 1515-22.
166. Cheung, J.L., et al., *Increase of integration events and infection loads of human papillomavirus type 52 with lesion severity from low-grade cervical lesion to invasive cancer*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(4): p. 1356-62.
167. Song, S., et al., *Human papillomavirus types 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis*. Virology, 2000. **267**(2): p. 141-50.
168. Thomas, M., et al., *Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity*. Oncogene, 2008. **27**(55): p. 7018-30.
169. Kranjec, C. and L. Banks, *A systematic analysis of human papillomavirus (HPV) E6 PDZ substrates identifies MAGI-1 as a major target of HPV type 16 (HPV-16) and HPV-18 whose loss accompanies disruption of tight junctions*. J Virol, 2011. **85**(4): p. 1757-64.
170. Hoskins, A.A., et al., *Ordered and dynamic assembly of single spliceosomes*. Science, 2011. **331**(6022): p. 1289-95.
171. Siala, O., et al., *Subtle discrepancies of SF2/ASF ESE sequence motif among human tissues: A computational approach*. Comput Biol Chem, 2010. **34**(3): p. 203-9.
172. Solis, A.S. and J.G. Patton, *Analysis of SRp86-regulated alternative splicing: control of c-Jun and Ikbpp activity*. RNA Biol, 2010. **7**(4): p. 486-94.
173. Warzecha, C.C., et al., *The epithelial splicing factors ESRP1 and ESRP2 positively and negatively regulate diverse types of alternative splicing events*. RNA Biol, 2009. **6**(5): p. 546-62.
174. Yeo, G.W., et al., *Alternative splicing events identified in human embryonic stem cells and neural progenitors*. PLoS Comput Biol, 2007. **3**(10): p. 1951-67.
175. Salomonis, N., et al., *Alternative splicing in the differentiation of human embryonic stem cells into cardiac precursors*. PLoS Comput Biol, 2009. **5**(11): p. e1000553.
176. Cox, E.T., et al., *Developmental regulation of neural cell adhesion molecule in human prefrontal cortex*. Neuroscience, 2009. **162**(1): p. 96-105.
177. McFarlane, M. and S.V. Graham, *Human papillomavirus regulation of SR proteins*. Biochem Soc Trans, 2010. **38**(4): p. 1116-21.
178. Scotlandi, K., et al., *CD99 isoforms dictate opposite functions in tumour malignancy and metastases by activating or repressing c-Src kinase activity*. Oncogene, 2007. **26**(46): p. 6604-18.
179. Kim, C.J., et al., *Role of alternative splicing of periostin in human bladder carcinogenesis*. Int J Oncol, 2008. **32**(1): p. 161-9.
180. Xi, L., et al., *Whole genome exon arrays identify differential expression of alternatively spliced, cancer-related genes in lung cancer*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(20): p. 6535-47.
181. Boukamp, P., et al., *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line*. J Cell Biol, 1988. **106**(3): p. 761-71.
182. Gey GO, C.W., Kubicek MT, *Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium*. Cancer Res, 1952. **12**(4): p. 264-265.
183. Rasheed, S., et al., *Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080)*. Cancer, 1974. **33**(4): p. 1027-33.
184. Ellison, G., et al., *Further evidence to support the melanocytic origin of MDA-MB-435*. Mol Pathol, 2002. **55**(5): p. 294-9.

185. Todaro, G.J. and H. Green, *Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines*. J Cell Biol, 1963. **17**: p. 299-313.
186. Freedman, R.S., et al., *Characterization of a cell line (SW756) derived from a human squamous carcinoma of the uterine cervix*. In Vitro, 1982. **18**(8): p. 719-26.
187. Berridge, M.V. and A.S. Tan, *Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction*. Arch Biochem Biophys, 1993. **303**(2): p. 474-82.
188. Saito, K., et al., *A modified and convenient method for assessing tumor cell invasion and migration and its application to screening for inhibitors*. Biol Pharm Bull, 1997. **20**(4): p. 345-8.
189. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
190. Wollscheid, V., et al., *Identification of a new proliferation-associated protein NET-1/C4.8 characteristic for a subset of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinomas*. Int J Cancer, 2002. **99**(6): p. 771-5.
191. Eck, S.C. and L.A. Turka, *Generation of protective immunity against an immunogenic carcinoma requires CD40/CD40L and B7/CD28 interactions but not CD4(+) T cells*. Cancer Immunol Immunother, 1999. **48**(6): p. 336-41.
192. Conesa-Zamora, P., et al., *Effect of human papillomavirus on cell cycle-related proteins p16, Ki-67, Cyclin D1, p53, and ProEx C in precursor lesions of cervical carcinoma: a tissue microarray study*. Am J Clin Pathol, 2009. **132**(3): p. 378-90.
193. Steller, M.A., et al., *Transformation by human papillomavirus 16 E6 and E7: role of the insulin-like growth factor 1 receptor*. Cancer Res, 1996. **56**(21): p. 5087-91.
194. Shi, L., et al., *Specific Drosophila Dscam juxtamembrane variants control dendritic elaboration and axonal arborization*. J Neurosci, 2007. **27**(25): p. 6723-8.
195. Yamakawa, K., et al., *DSCAM: a novel member of the immunoglobulin superfamily maps in a Down syndrome region and is involved in the development of the nervous system*. Hum Mol Genet, 1998. **7**(2): p. 227-37.
196. Hauwel, M., E. Furon, and P. Gasque, *Molecular and cellular insights into the coxsackie-adenovirus receptor: role in cellular interactions in the stem cell niche*. Brain Res Brain Res Rev, 2005. **48**(2): p. 265-72.
197. Carlisle, R.C., et al., *Human erythrocytes bind and inactivate type 5 adenovirus by presenting Coxsackie virus-adenovirus receptor and complement receptor 1*. Blood, 2009. **113**(9): p. 1909-18.
198. Othman, M., et al., *Adenovirus-induced thrombocytopenia: the role of von Willebrand factor and P-selectin in mediating accelerated platelet clearance*. Blood, 2007. **109**(7): p. 2832-9.
199. Sobocka, M.B., et al., *Cloning of the human platelet F11 receptor: a cell adhesion molecule member of the immunoglobulin superfamily involved in platelet aggregation*. Blood, 2000. **95**(8): p. 2600-9.
200. Avecilla, S.T., et al., *Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis*. Nat Med, 2004. **10**(1): p. 64-71.
201. Lazar-Karsten, P., et al., *The influence of extracellular matrix proteins and mesenchymal stem cells on erythropoietic cell maturation*. Vox Sang, 2010.
202. Deutsch, V., et al., *Mimicking the haematopoietic niche microenvironment provides a novel strategy for expansion of haematopoietic and megakaryocyte-progenitor cells from cord blood*. Br J Haematol, 2010. **149**(1): p. 137-49.
203. Penny, R., M.C. Rozenberg, and B.G. Firkin, *The splenic platelet pool*. Blood, 1966. **27**(1): p. 1-16.
204. McRedmond, J.P., et al., *Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes*. Mol Cell Proteomics, 2004. **3**(2): p. 133-44.
205. Kitada, M., Y. Kuroda, and M. Dezawa, *Lectins as a tool for detecting neural stem/progenitor cells in the adult mouse brain*. Anat Rec (Hoboken), 2011. **294**(2): p. 305-21.
206. Gronthos, S. and A.C. Zannettino, *Methods for the purification and characterization of human adipose-derived stem cells*. Methods Mol Biol, 2011. **702**: p. 109-20.
207. Anglani, F., et al., *The regenerative potential of the kidney: what can we learn from developmental biology?* Stem Cell Rev, 2010. **6**(4): p. 650-7.
208. Pincelli, C. and A. Marconi, *Keratinocyte stem cells: friends and foes*. J Cell Physiol, 2010. **225**(2): p. 310-5.
209. Tashiro, K., et al., *Adenovirus vector-mediated efficient transduction into human embryonic and induced pluripotent stem cells*. Cell Reprogram, 2010. **12**(5): p. 501-7.
210. Ugrumov, M.V., *Developing brain as an endocrine organ: a paradoxical reality*. Neurochem Res, 2010. **35**(6): p. 837-50.

- 211. Marchant, D., et al., *ERK MAP kinase-activated Arf6 trafficking directs coxsackievirus type B3 into an unproductive compartment during virus host-cell entry*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 4): p. 854-62.
- 212. Wan, H., et al., *Stem/progenitor cell-like properties of desmoglein 3dim cells in primary and immortalized keratinocyte lines*. Stem Cells, 2007. **25**(5): p. 1286-97.
- 213. Longworth, M.S. and L.A. Laimins, *The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31*. J Virol, 2004. **78**(7): p. 3533-41.
- 214. Bodily, J.M., K.P. Mehta, and L.A. Laimins, *Human papillomavirus E7 enhances hypoxia-inducible factor 1-mediated transcription by inhibiting binding of histone deacetylases*. Cancer Res, 2011. **71**(3): p. 1187-95.
- 215. Hwang, S.G., et al., *Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner*. J Biol Chem, 2002. **277**(4): p. 2923-30.
- 216. Durst, M., et al., *Glucocorticoid-enhanced neoplastic transformation of human keratinocytes by human papillomavirus type 16 and an activated ras oncogene*. Virology, 1989. **173**(2): p. 767-71.
- 217. Durst, M., et al., *Malignant progression of an HPV16-immortalized human keratinocyte cell line (HPK1A) in vitro*. Cancer Genet Cytogenet, 1995. **85**(2): p. 105-12.
- 218. Higashikawa, K., et al., *Evaluation of CD44 transcription variants in human digestive tract carcinomas and normal tissues*. Int J Cancer, 1996. **66**(1): p. 11-7.
- 219. Caruso, L., et al., *Cardiomyocyte-targeted overexpression of the coxsackie-adenovirus receptor causes a cardiomyopathy in association with beta-catenin signaling*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(6): p. 1194-205.
- 220. Farmer, C., et al., *Coxsackie adenovirus receptor (CAR) regulates integrin function through activation of p44/42 MAPK*. Exp Cell Res, 2009. **315**(15): p. 2637-47.
- 221. Jayagopal, A., et al., *Tight junction-associated signaling pathways modulate cell proliferation in uveal melanoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(1): p. 588-93.
- 222. Klingler-Hoffmann, M., P. Bukczynska, and T. Tiganis, *Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase signaling negates the growth advantage imparted by a mutant epidermal growth factor receptor on human glioblastoma cells*. Int J Cancer, 2003. **105**(3): p. 331-9.
- 223. Park, M.J., et al., *PTEN suppresses hyaluronic acid-induced matrix metalloproteinase-9 expression in U87MG glioblastoma cells through focal adhesion kinase dephosphorylation*. Cancer Res, 2002. **62**(21): p. 6318-22.
- 224. Polette, M., et al., *Membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression is regulated by zonula occludens-1 in human breast cancer cells*. Cancer Res, 2005. **65**(17): p. 7691-8.
- 225. Wang, H., et al., *Rap-GEF signaling controls stem cell anchoring to their niche through regulating DE-cadherin-mediated cell adhesion in the Drosophila testis*. Dev Cell, 2006. **10**(1): p. 117-26.

7. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Runnebaum für die Überlassung des interessanten Themas und für seine stete Bereitschaft, das Projekt durch anregende Diskussionen zu unterstützen. Danken möchte ich auch Prof. Dürst für die Möglichkeit, mein Thema im Labor für Gynäkologische Molekularbiologie zu bearbeiten. Seine hervorragende Betreuung und seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft haben maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen und auch in schwierigen Phasen immer ein Weiterkommen ermöglicht. Ebenfalls gilt mein Dank Prof. Agricola und Prof. Pützer für die Übernahme der Gutachten.

Danken möchte ich weiterhin allen Mitarbeitern und Kollegen des Forschungslabors, die für inhaltliche Fragen und Diskussionen immer offen waren, stets Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit leisteten und die durch ihre freundschaftliche Art fortwährend eine angenehme Arbeitsatmosphäre geschaffen haben. Zusätzlich bin ich all jenen zu Dank verpflichtet, die sich in ihrer freien Zeit mit den kleinen und größeren Korrekturen dieser Dissertation befasst haben und somit zur finalen Abrundung der Inhalte beigetragen haben.

Großer Dank gilt meinen Eltern, die durch Ermöglichung meines Studiums der Biochemie erst den Grundstein für die hier vorliegende Arbeit gelegt haben.

Abschließend möchte ich mich auch besonders bei meinem Ehemann bedanken, der mich während der letzten Jahre fortwährend unterstützt hat, für die zeitliche Belastung immer volles Verständnis aufbringen konnte und mir auch sonst jeden Tag seine Liebe gezeigt hat.

8. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbst und nur mit Unterstützung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben. Insbesondere wurden keine Textabschnitte oder Abbildungen eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen.

Jena, den 12. Oktober 2011

Marit Dietel

9. Lebenslauf

Name: Marit Dietel, geb. Orlamünder
Adresse: Anna-Siemsen-Strasse 29
07745 Jena

Telefon: 03641/514936
E-Mail: Marit.Dietel@gmail.com
geb. am: 23.02.1982
in: Schleiz
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung und Auslandsaufenthalt

09/1988 – 08/1992 Rötlein-Grundschule, Zeulenroda
09/1992 – 07/1996 Gymnasium Friedrich-Schiller, Zeulenroda
08/1996 – 06/2001 Gymnasium Dr.-Konrad-Duden, Schleiz
Abschluss: Abitur (Note 1,3)
09/1998 – 05/1999 Auslandsjahr (Norwegen)

Studium

10/2001 – 11/2006 Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Studiengang: Biochemie/Molekularbiologie
Schwerpunkt: Molekulare Medizin

Arbeit als Wissenschaftliche Hilfskraft in den
Bereichen Zellbiologie und Biochemie

Diplomarbeit im Bereich Zellbiologie

Abschluss: Diplom (Note 1,1)

Berufstätigkeit

seit 02/2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Forschungslabor
„Gynäkologische Molekularbiologie“

Publikationen

Nguyen H, Orlamuender M, Pretzel D, Agricola I, Sternberg U, Reissmann S. *Transition metal complexes of a cyclic pseudo hexapeptide: synthesis, complex formation and catalytic activities*. J Pept Sci. 2008 Sep;14(9):1010-21

M. Dietel, N. Häfner, L. Jansen, M. Dürst, I.B. Runnebaum. *Identification and characterization of CAR 4/6 as a new splice variant of the Coxsackie Adenovirus Receptor (CAR) differentially expressed in cervical cancer progression*; J Mol Med. 2011 Mar 23. [Epub ahead of print]

Jena, den 12. Oktober 2011

Marit Dietel

10. Anhang

10.1. Plasmidvektorkarten

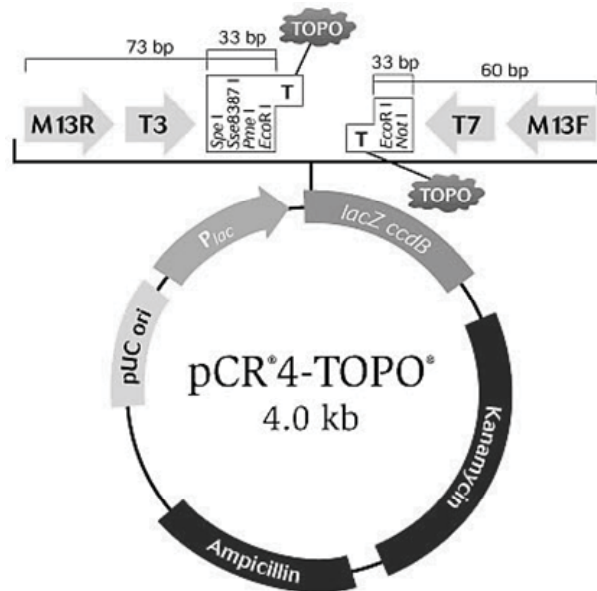


Abbildung 10.1 Vektorkarte des pCR4-TOPO Vektors, welcher zur initialen Klonierung der CAR-Isoformen heran gezogen wurde.

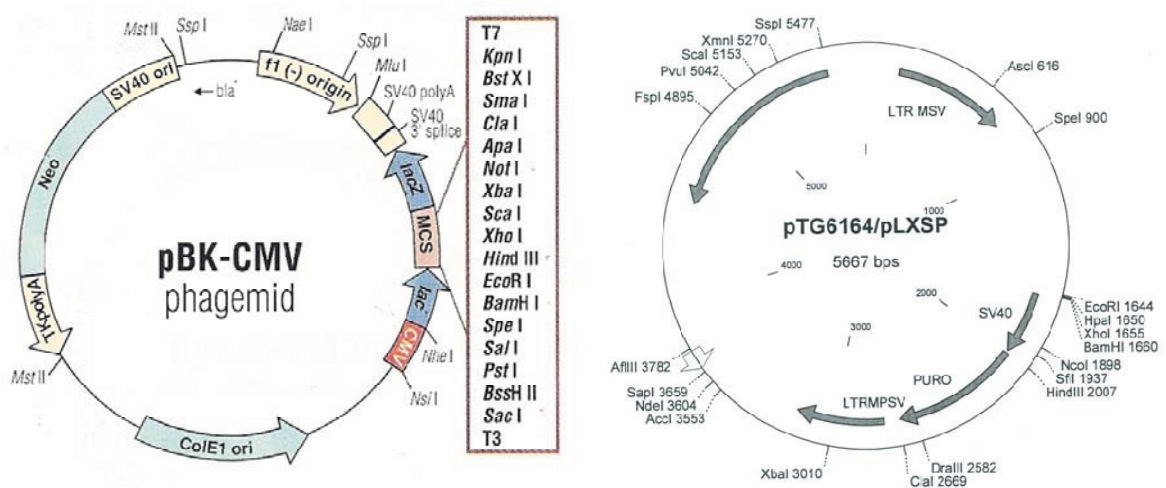


Abbildung 10.2 Vektorkarten der eukaryotischen Expressionsvektoren pBK-CMV und pLXSP. In dem in dieser Arbeit verwendeten pBK-CMV-Vektor wurde die Sequenz zwischen NheI und SpeI (multiple cloning site, MCS) mittels Restriktionsverdau entfernt (Δ NheI-SpeI), um den prokaryotischen lac-Promotor abzutrennen.

10.2. Rohdaten der Spleißvarianten-spezifischen quantitativen RealTime-PCR

Sample Nr NG	Ct β -Aktin	Ct CAR4/6	Rel. 4/6 Expr.	Ct CAR6/7	Rel. 6/7 Expr.
22	12,78	-	-	28,1	2,44E-05
23	19,02	-	-	32,64	7,94E-05
16	17,13	-	-	29,8	1,53E-04
17	18,53	-	-	38,95	7,13E-07
18	16,59	-	-	33,36	8,95E-06
12	14,4	-	-	30,48	1,44E-05
13	16,22	-	-	35,06	2,13E-06
Sample Nr CIN	Ct β -Aktin	Ct CAR4/6	Rel. 4/6 Expr.	Ct CAR6/7	Rel. 6/7 Expr.
53	20,33	-	-	33,86	8,45E-05
54	20	-	-	31,95	2,53E-04
55	14,07	38,66	8,65E-08	26,2	2,23E-04
56	16,1	38,9	3,00E-07	25,47	1,51E-03
57	15,49	33,38	8,08E-06	25,33	1,09E-03
58	15,58	-	-	29,76	5,39E-05
59	13,86	-	-	29,19	2,43E-05
60	15,37	33,33	7,69E-06	24,15	2,27E-03
61	18,05	-	-	30,62	1,64E-04
62	17,17	-	-	29,18	2,42E-04
63	21,08	-	-	31,35	8,10E-04
64	19,34	35,44	2,91E-05	30,81	3,53E-04
Sample Nr T1	Ct β -Aktin	Ct CAR4/6	Rel. 4/6 Expr.	Ct CAR6/7	Rel. 6/7 Expr.
24	13,35	38,36	6,42E-08	23,95	6,44E-04
25	12,11	32,32	1,58E-06	21,64	1,35E-03
26	19,59	-	-	30,9	3,94E-04
19	14,7	-	-	28,53	6,87E-05
20	10,83	36,18	4,86E-08	22,25	3,65E-04
21	14,21	-	-	29,53	2,44E-05
65	15,55	-	-	26,82	4,05E-04
66	12,12	36,96	7,03E-08	28,31	1,34E-05
33	15,48	33,29	8,53E-06	21,68	1,36E-02
35	14,73	29,46	6,67E-05	28,16	9,06E-05
15	12,12	36,96	7,03E-08	28,31	1,34E-05
14	15,55	-	-	26,82	4,05E-04
40	13,71	35,5	5,65E-07	22,96	1,64E-03
41	15,31	34,84	2,67E-06	22,62	6,30E-03
42	13,07	33,16	1,75E-06	25,63	1,66E-04
43	14,57	39,2	8,50E-08	22,65	3,70E-03

Sample Nr T2	Ct β -Aktin	Ct CAR4/6	Rel. 4/6 Expr.	Ct CAR6/7	Rel. 6/7 Expr.
7	11,76	29,85	6,55E-06	20	3,31E-03
27	13,6	-	-	22,94	1,54E-03
28	18,21	-	-	28,6	7,45E-04
29	14,26	-	-	25,33	4,65E-04
30	12,33	28,89	1,86E-05	25,9	8,22E-05
31	17,01	-	-	31,78	3,58E-05
32	15,9	31,38	4,12E-05	20,44	4,30E-02
34	12,14	-	-	21,79	1,24E-03
36	14,02	35,53	6,86E-07	27,91	6,59E-05
37	18,81	37,15	6,38E-06	35,64	8,58E-06
38	15,77	40,22	9,83E-08	23,22	5,72E-03
39	12,44	36,74	1,02E-07	28,83	1,16E-05
45	14,04	30,7	1,80E-05	20,25	1,35E-02
46	12,44	40,35	8,96E-09	25,4	1,26E-04
Sample Nr T3/T4	Ct β -Aktin	Ct CAR4/6	Rel. 4/6 Expr.	Ct CAR6/7	Rel. 6/7 Expr.
1	9,9	32,94	2,26E-07	25,4	2,16E-05
8	11,15	-	-	27,97	8,64E-06
9	11,28	27,33	2,56E-05	19,04	4,61E-03
10	10,15	40,23	1,99E-09	25,55	2,31E-05
11	13,31	36,14	2,78E-07	27,84	4,23E-05
44	14,07	33,88	2,16E-06	26,75	1,52E-04
49	13,59	34,12	1,32E-06	27,83	5,17E-05
51	22,04	34,6	3,33E-04	22,95	5,32E-01
52	10,89	-	-	22,71	2,77E-04
2	11,73	29,76	6,82E-06	25,87	5,54E-05
3	10,94	-	-	24,27	9,71E-05
4	10,68	37,29	2,07E-08	21,02	7,72E-04
5	10,25	31,71	6,58E-07	23,26	1,21E-04
6	13,1	26,02	2,18E-04	18,1	3,13E-02
47	20,14	-	-	30,35	8,44E-04
48	15,31	29,87	7,57E-05	20,63	2,50E-02
50	19,67	34,16	8,67E-05	22,11	1,84E-01

Abbildung 10.3 Rohdaten der Spleißvarianten-spezifischen quantitativen RealTime-PCR. Dargestellt sind Ct-Werte für β -Aktin, CAR4/6 und CAR6/7. Die detektierten Mengen an β -Aktin mRNA unterscheiden sich nicht zwischen CAR4/6-positiven und CAR4/6-negativen Proben. Die einzelnen Probenkollektive sind verschiedenfarbig unterlegt. Rel. CAR4/6 Expr. = $2^{\text{ct}(\beta\text{-aktin})/1,96^{\text{ct}(4/6)}}$; Rel. CAR6/7 Expr. = $2^{\text{ct}(\beta\text{-aktin})-\text{ct}(6/7)}$. NG - Normalgewebe

10.3. Abkürzungsverzeichnis

AA	amino acid
Ad	Adenoviren
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest	einfach destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
Bidest	doppelt destilliertes Wasser
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Kalziumion
CAM	cell adhesion molecule
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
cDNA	complementary DNA
CDS	coding sequence
CHO	chinese hamster ovary
CIN	Cervical Intraepithelial Neoplasia
CMV	Cytomegalievirus
Ct	Cycle Threshold
CVB	Coxsackieviren von Typ B
CxCa	cervical carcinoma (Gebärmutterhalskrebs)
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	early gene des HPV-Genoms alternativ: PCR-Effizienz
ECM	extra cellular matrix
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EMT	epithelial-mesenchymal transition
F	forward primer
FCS	Fötales Kälberserum
FFPET	formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
G	Grading
GOI	gene of interest
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	human
HDAC	Histondeacetylase
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HKG	housekeeping gen
HPV	humane Papillomviren
HR	high risk
HRP	horse reddish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
IHC	Immunhistochemie
Ig-	Immunglobulin-
JAM	junctional adhesion molecule
kb	kilobasen

kD	Kilodalton
L	late gene
LB	lysogeny broth
LCR	long control region
LR	low risk
LSM	Laserscanmikroskopie
LV	Leervektor
m	murin
(m)M	(milli)molar
MAGI	Membran-assoziierte Guanylatkinase
MCS	multiple cloning site (Multiple Klonierungsstelle; Polylinker)
MEV	Megakaryoblasten/Erythroblasten-Vorläuferzellen
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
NaPP	Natriumpyrophosphat
NG	Normalgewebe
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDZ	Post synaptic density protein 95, <u>D</u> rosophila disc large tumor suppressor and <u>Z</u> onula occludens-1
PET	polyethylene terephthalate
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-	quantitative RealTime-
R	reverse Primer
Rb	Retinoblastomprotein
RGD	Aminosäuresequenz Arginin (R) - Glycin (G) - Aspartat (D)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur alternativ: Reverse Transkription
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SR	Serin (S) / Arginin (R)-reich
SSC	saline-sodium citrate
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIMP	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
TJ	Tight Junctions
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
w/v	weight to volume
z.B.	zum Beispiel
ZO-1,-2,-3	zonula occludens-Protein-1,-2,-3